

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
ІМЕНІ ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

«До захисту допущено»

Завідувач кафедри

_____ Кузьмінський Є.В.
(підпис) (ініціали, прізвище)

“ ” _____ 2019р.

Дипломний робота

на здобуття ступеня бакалавра

з напрямку підготовки 6.051401 «Біотехнологія»
(код і назва)

на тему: Вплив сполук сульфуру на ріст мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

Виконав (-ла): студент (-ка) IV курсу, групи БЕ-51
(шифр групи)

_____ Єськова Катерина Олегівна
(прізвище, ім'я, по батькові)

_____ (підпис)

Керівник

_____ к.т.н., асист. Левтун І.І.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Рецензент

_____ д.б.н., проф. Галкін О.Ю
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

_____ (підпис)

Засвідчую, що у цьому дипломному
проекті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент _____
(підпис)

Київ – 2019 року

**Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»**

Інститут (факультет) біотехнології та біотехніки
(повна назва)

Кафедра екобіотехнології та біоенергетики
(повна назва)

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Напрямок підготовки 6.051401 «Біотехнологія»
(код і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Кузьмінський Є.В.
(підпис) (ініціали, прізвище)

«__» _____ 2019 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломну роботу студенту
Єськовій Катерині Олегівні
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Вплив сполук сульфору на ріст мікробіодоростей
Chlorella vulgaris

керівник роботи к.т.н., асист. Левтун І.І.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом по університету від «__» _____ 20__ р. № _____

2. Термін подання студентом роботи _____

3. Вихідні дані до роботи визначити вплив сполук сульфору на ріст та розвиток мікробіодоростей *Chlorella vulgaris*

4. Зміст роботи дати характеристику біологічному об'єкту; проаналізувати сучасний стан досліджень впливу сполук сульфору на ріст та розвиток клітин *Chlorella vulgaris*; визначити методи та матеріали дослідження; дослідити вплив Na_2S у різних концентраціях на ріст та розвиток *Chlorella vulgaris* та біосинтез хлорофілів *a* і *b*; вивчити перехід форм сполук сульфору у культуральному середовищі; навести перелік заходів щодо охорони праці та охорони довкілля.

5. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо) три аркуша формату А1 графічного матеріалу, презентація.

6. Дата видачі завдання 15.02.2019

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1	Вибір теми дипломної роботи	28.01.2019-11.02.2019	
2	Отримання завдання до дипломної роботи	15.02.2019	
3	Огляд літератури за заданою темою	16.02.2019-21.04.2019	
4	Вибір методів та матеріалів	18.02.2019-24.02.2019	
5	Проведення експериментальної частини	26.02.2019-20.04.2019	
6	Обробка та аналіз результатів	22.04. 2019-06.05.2019	
7	Оформлення пояснювальної записки	13.05. 2019-21.05.2019	
8	Передзахист	03.06.2019	
9	Захист	18.06.2019	

Студент

(підпис)

Єськова К.О.
(ініціали, прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Левтун І.І.
(ініціали, прізвище)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 66 с., 16 рис., 3 табл., 60 посилань.

Досліджено вплив сульфідів на ріст мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з метою її культивування для очищення біогазу від сірководню.

У роботі проаналізовано сучасний стан досліджень впливу сполук сульфуру на ріст клітин *Chlorella vulgaris* та охарактеризовано біологічний агент. Обрано матеріали та методи дослідження.

Проведено експериментальну частину, у ході якої було досліджено вплив Na_2S у різних концентраціях на ріст та розвиток *Chlorella vulgaris* при однаковій та різній вихідній концентрації клітин мікроводорості; досліджено вплив Na_2S у різних концентраціях на біосинтез хлорофілів *a* та *b* у *Chlorella vulgaris*. Вивчено перехід форм сполук сірки у культуральному середовищі. Визначено раціональну початковою концентрацією сульфід-іонів у культуральному середовищі з метою культивування *Chlorella vulgaris* для очищення біогазу від сірководню.

Наведено пропозиції та заходи, щодо забезпечення охорони довкілля та охорони праці при виконанні робіт в лабораторії.

CHLORELLA VULGARIS, БІОЛОГІЧНЕ ОЧИЩЕННЯ ГАЗОВИХ ВИКИДІВ, БІОГАЗ, КУЛЬТИВУВАННЯ, МІКРОВОДОРОСТІ, СУЛЬФУР, СІРКОВОДЕНЬ, СУЛЬФІДИ.

ABSTRACT

The explanatory note: 60 p., 10 fig., 33 tables, 49 references.

The influence of sulfides on the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* with the purpose of its cultivation for hydrogen sulfide removal from biogas was investigated.

The current state of research on this topic was analyzed and the biological agent was described. Materials and research methods were chosen.

An experimental part was conducted, during which the effect of Na_2S in different concentrations on the growth and development of *Chlorella vulgaris* at the same and different initial concentrations of microalgae cells as well as the biosynthesis of chlorophylls a and b was studied. The transition of sulfur compound forms in the culture medium was studied. The rational initial concentration of sulfide ions in the culture medium was determined for the purpose of cultivating *Chlorella vulgaris* for hydrogen sulfide removal from biogas.

Proposals and measures of ensuring labor and environmental protection during work performance at the laboratory are given.

CHLORELLA VULGARIS, BIOLOGICAL TREATMENT OF GAS EMISSIONS, BIOGAS, CULTIVATION, MICROALGAE, SULFUR, HYDROGEN SULFIDE, SULFIDE.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1 ХАРАКТЕРИСТИКА <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	11
1.1 Місце в систематиці та поширення	11
1.2 Морфологія	11
1.3 Репродукція	12
1.4 Хімічний склад	13
1.5 Застосування.....	14
1.6 Фактори, які впливають на життєдіяльність <i>Chlorella vulgaris</i>	21
1.6.1 Вплив температури.....	22
1.6.2 Вплив рН.....	23
1.6.3 Вплив факторів мінерального живлення	24
1.7 Роль Сульфуру в життєдіяльності клітин <i>Chlorella vulgaris</i>	26
1.7.1 Метаболізм Сульфуру в клітинах.....	28
1.7.2 Вплив різних сполук сірки на ріст <i>Chlorella vulgaris</i>	30
1.7.3 Вплив Сульфуру на біосинтез хлорофілу	34
1.7.4 Вплив Сульфуру на біосинтез ліпідів	36
1.8 Типи фотобіореакторів.....	37
Висновки до розділу	40
РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМКІВ ТА МЕТОДИК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
2.1 Склад поживного середовища	44
2.2 Лабораторна установка для нарощування біомаси	44
2.3 Методика внесення H_2S в культуральне середовище.....	45
2.4 Визначення приросту біомаси, кількості та розмірів клітин	45
2.5 Визначення вмісту хлорофілів а та b.....	46
2.6 Визначення вмісту ліпідів у біомасі мікроводоростей.....	47
2.7 Визначення сульфід та сульфат іонів.....	47
2.8 Математична обробка одержаних даних і оцінка похибок	48
Висновки до розділу	49

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	50
Висновки до розділу	60
РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ.....	61
Висновки до розділу	64
ВИСНОВКИ	65
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	66

ВСТУП

Актуальність проблеми. Проблема енергетичної кризи та техногенних викидів у атмосферу, зокрема вуглекислого газу, оксидів азоту та сірки, стала глобальною для останніх кілька років. Причому з кожним роком приріст концентрації даних оксидів зростає в геометричній прогресії. Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря планети за багатьма сполуками у багато разів перевищили допустимий рівень, що може стати причиною серйозних змін клімату і врешті решт екологічної катастрофи [1]. Крім того стрімкий розвиток промисловості призвів до виснаження світових запасів викопного палива. Тому останнім часом активно впроваджуються технології відновлювальної енергетики, зокрема отримання різних видів біопалива, найбільш доступним з яких на сьогодні є біогаз. Основною ж проблемою при отриманні біогазу є його очищення від домішок, зокрема CO_2 та H_2S [2].

Згідно з концепцією сталого розвитку людства актуальними завданнями сучасного суспільства є раціональне використання природних ресурсів, зниження екологічного навантаження і побудова раціональної, екологічно стійкої і економічно обґрунтованої соціальної системи. Найбільшу практичну значимість являють собою процеси, що забезпечують за рахунок утилізації існуючих відходів і трансформації відновлювальних ресурсів отримання комерційно цінних продуктів безвідходним способом [3]. Тому особливої уваги заслуговують біологічні методи очищення, які сприяють досягнення даної мети.

Біологічне очищення полягає у здатності мікроорганізмів включати у свій метаболізм різноманітні сполуки, у тому числі забруднюючі речовини, розкладання яких відбувається під дією ферментів. В результаті цього забруднюючі речовини, які необхідно усунути, трансформуються в нешкідливі продукти життєдіяльності мікроорганізмів та в біомасу [4].

На сьогоднішній день особливої уваги заслуговують мікродорості, які є досить ефективними перетворювачами сонячної енергії з добре організованими стадіями відновлення CO_2 до цілого комплексу біомолекул, включаючи вуглеводи, білки, ліпіди, які можуть бути задіяні у подальшій біотехнологічній трансформації в різні цільові продукти. Такі мікроорганізми можуть рости досить швидко в жорстких умовах, що зумовлено їх одноклітинною структурою [5].

Одними з найбільш продуктивних вважаються мікродорості роду *Chlorella*. Цей рід мікродоростей відомий давно і добре вивчений, що, безумовно, є явною перевагою для їх застосування в промисловості. Поряд з високою продуктивністю біомаси, ці клітини мають ряд особливостей, що дозволяють вважати їх найбільш придатними для використання в біотехнологічних процесах в якості субстрату. Перевагою мікродоростей, що відносяться до роду *Chlorella*, є їх виняткова пристосованість до змін навколишнього середовища [6].

Нарощування біомаси мікродоростей можна реалізувати шляхом використання вуглекислого газу, який утворюється при метановому бродінні. Таким чином немає потреби витрачати кошти на отримання необхідного для фотоавтотрофних організмів вуглекислого газу. Крім того, вирішується проблема очищення біогазу від сірководню. Адже Сульфур є макроелементом, що є необхідним для життєдіяльності мікродоростей, тому сполуки сірки, в певних концентраціях можуть споживатися мікродоростями, не пригнічуючи їх ріст. Причому такий спосіб використання мікродоростей цікавий не лише через очищення біогазу, але й тому, що це дозволяє отримати цінну біомасу, що використовується в якості сировини в різних біотехнологічних процесах.

На відміну від сірководню та інших сполук сірки, дослідженню впливу вуглекислого газу на мікродорості присвячено багато робіт і це питання достатньо висвітлено. Тому дослідження процесу росту та розвитку мікродоростей при вмісті у культуральному середовищі сполук сірки є актуальною проблемою.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – дослідити вплив сульфідів на ріст та розвиток мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Для досягнення мети передбачено виконання таких завдань:

- провести літературний огляд стосовно питання впливу сполук сульфуру на ріст та розвиток клітин *Chlorella vulgaris* та накопичення ліпідів;
- дослідити вплив Na_2S у різних концентраціях на ріст та розвиток *Chlorella vulgaris*;
- дослідити вплив Na_2S у різних концентраціях на біосинтез хлорофілів *a* та *b* у *Chlorella vulgaris*;
- вивчити перехід форм сполук сульфуру у культуральному середовищі.

Новизна роботи. Вперше визначено раціональну концентрацію сульфід-іонів для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою очищення біогазу від сірководню.

Об'єкт дослідження. Процес культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* за різної концентрації сульфідів.

Предмет дослідження. Вплив сульфідів на ріст мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА *CHLORELLA VULGARIS*

1.1 Місце в систематиці та поширення

Зелена мікроводорість *Chlorella vulgaris* належить до наступної наукової класифікації: домен *Eukaryota* → царство *Protista* → відділ *Chlorophyta* → порядку *Chlorellales* → родини *Chlorellaceae* → рід *Chlorella* → вид *Chlorella vulgaris* [7].

Chlorella vulgaris не вибаглива до умов навколишнього середовища і здатна досить інтенсивно розмножуватися, тому дуже широко поширена і зустрічається практично повсюдно. У водоймах – це типова планктонна водорість, але зустрічається вона і бентосі, а також на наземних субстратах і в ґрунті [8].

1.2 Морфологія

Молоді клітини *C. vulgaris* еліпсоїдної форми, розміром від 1.5 до 2.0 мкм, зрілі - шароподібні, діаметром 6–9 мкм. Зовні клітини вкриті твердою двоконтурною оболонкою целюлозної природи, яка забезпечує цілісність клітини і захист від паразитів і умов навколишнього середовища. Клітинна оболонка змінює свій хімічний склад і товщину відповідно до кожної фази росту та умов навколишнього середовища. Жорсткість клітинної стінки обумовлена хітозаноподібним шаром, що складається з глюкозаміну. Крім того, деякі дослідження пояснюють жорсткість клітинної стінки присутністю спорополеніну - надзвичайно стійкого полімеризованого каротиноїда, який входить до складу клітинних стінок спор та пилку вищих рослин [7, 9].

C. vulgaris містить такі органели, як ядро, мітохондрії, вакуолі, один хлоропласт і тільця Гольджі. Клітини однопідрні, містять лише одну мітохондрію; розмір ядра близько 1 мкм. Цитоплазма пронизана системою розгалужених каналців ендоплазматичного ретикулума, які в деяких місцях розширюючись, утворюють цистерни чи пухирці з мембраною, яка несе рибосоми. Всередині

клітин *C. vulgaris* містяться мікротрубочки, їх кількість та локалізація непостійна, і залежить від функціонального стану клітини. Мікротрубочки з'являються перед каріокінезом, а зникають по завершенню цитокінезу. Також в клітинах присутні пероксисоми, що містять фермент гліколатдегідрогеназу, що бере участь у процесі фотодихання [10].

Хлоропласт оточений подвійною мембраною; зовнішня мембрана проникна для метаболітів та іонів, внутрішня мембрана має більш специфічну функцію, пов'язану з транспортом білків. Забарвлення хлоропласту може мати різноманітні відтінки зеленого кольору, які зумовлені присутністю і різним співвідношенням хлорофілів *a* і *b*, α -, β -, γ -, ϵ -каротинів, а також ксантофілів, лютеїну, віолаксантину, неоксантину, зеаксантину, антераксантину. Несприятливі умови можуть призводити до суттєвих змін співвідношення компонентного складу пігментів у напрямку переважання каротиноїдів [11].

Піреноїд містить значну кількість рибулозо-1.5-бісфосфат-карбоксилази і є центром фіксації вуглекислоти. Крохмальні зерна можуть утворюватися всередині хлоропласту навкруги піреноїда та в стромі, особливо при несприятливих умовах росту [10].

Хлорела добре пристосовується до умов навколишнього середовища. Вона може витримувати короточасні впливи крайніх (1 та 12) значень рН середовища, різкі зміни концентрації та коливання температури [7].

1.3 Репродукція

Єдиний спосіб розмноження *C. vulgaris* - безстатевий, причому кожна гаплоїдна клітина мітотично ділиться двічі або тричі з утворенням відповідно чотирьох або восьми автоспор, які ще всередині материнської клітини покриваються власними оболонками. Після дозрівання автоспор відбувається розрив материнської клітинної стінки, дочірні клітини виходять назовні і можуть використати для живлення залишки материнської клітини.

Поділ клітин відбувається один раз на добу, але деякі штами хлорели в умовах інтенсивного культивування здатні до більш інтенсивного розмноження.

Процес розмноження *C. vulgaris* інтенсивний. За оптимальних умов за короткий час можна отримати приріст біомаси в 200 разів більший, ніж у вищих рослин [9,10].

Рухомих елементів розмноження у хлорели не існує. Аномальний характер циклу розвитку зустрічається нечасто і полягає у тому, що іноді клітини розмножуються відшнуровуванням дочірних особин від материнської клітини. Окрім того при нормальному поділі дочірні клітини можуть не виходити з материнської оболонки, залишаючись в ній на довгий час [12].

1.4 Хімічний склад

Використання *Chlorella vulgaris* засноване на дуже високому вмісті в ній біологічно цінних речовин. Мікроводорості містять більше 60 мікроелементів, концентрація яких значно вище, ніж у наземних рослин. Суха біомаса *C. vulgaris* містить більше 45-50% білків, включаючи незамінні амінокислоти; 30-35% вуглеводів, включаючи в основному крохмаль, целюлозу, геміцелюлозу і розчинні цукру; 5-10% ліпідів. У молодих клітинах, що активно розмножуються, у відсотковому співвідношенні білки переважають вуглеводи, але при досягненні клітин стаціонарної фази, в них переважають вуглеводи. Ліпіди, як важливі запасні речовини мікроводоростей, також в основному синтезуються під час стаціонарної фази росту. Їх застосовують для отримання нутріцевтичних речовин, таких як омега-3 і омега-6 поліненасичених жирних кислоти (ПНЖК), які в свою чергу корисно використовувати в раціоні харчування людини і тварин; і нейтральних ліпідів, які перспективні для виробництва біодизелю [13].

Доведено, що при зміні абіотичних факторів можна направити метаболізм мікроводоростей на синтез певних речовин, таким чином можна отримати біомасу з різним вмістом білків, ліпідів та вуглеводів. При цьому необхідно забезпечити

поєднання чималої кількості факторів, що впливають на рівень накопичення біомаси клітин і її біоорганічний компонентний склад, до яких відносять: вихідну концентрацію клітин в середовищі, склад середовища культивування, інтенсивність освітленості, температуру процесу [14].

У складі зеленої клітини містяться незамінні амінокислоти: лізин ($\approx 10\%$), метіонін ($\approx 1\%$), триптофан ($\approx 2\%$), аргінін ($\approx 15\%$), гістидин ($\approx 3\%$), лейцин ($\approx 6\%$), ізолейцин ($\approx 3\%$), фенілаланін ($\approx 2\%$), треонін ($\approx 2\%$) валін ($\approx 5\%$).

На частку вітамінів в біомасі *Chlorella vulgaris* припадають вітаміни груп В, С, РР, Е, каротин. Також в даній мікроводорості містяться необхідні для нормального функціонування організму людини і тварин макро- та мікроелементи: ферум, купрум, манган, цинк, молібден, бор, кобальт, силіцій тощо [15].

Мікроводорості виробляють широкий спектр хімічно активних вторинних метаболітів в якості хімічного захисту від хижаків, травоядних тварин, в умовах екологічного стресу і конкуренції за простір. *Chlorella vulgaris* синтезує природний антибіотик «хлорелін», який ефективно знищує патогенних мікроорганізмів, таких, як стрептококи, стафілококи, кишкова паличка [16].

1.5 Застосування

У даний час світовий обсяг продажів продуктів з мікроводоростей неухильно зростає: він оцінюється більше, ніж в 7 більйонів доларів США [16].

З огляду на величезне біологічне різноманіття мікроводоростей і недавні розробки в галузі генетичної і метаболічної інженерії, вважається, що мікроводорості, зокрема культура *Chlorella vulgaris*, є найбільш перспективним джерелом широкого спектру продуктів (рис. 1.1): білки, жирні кислоти, нейтральні та полярні ліпіди, полісахариди, антиоксиданти, вітаміни, барвники, водень, кисень тощо [17].

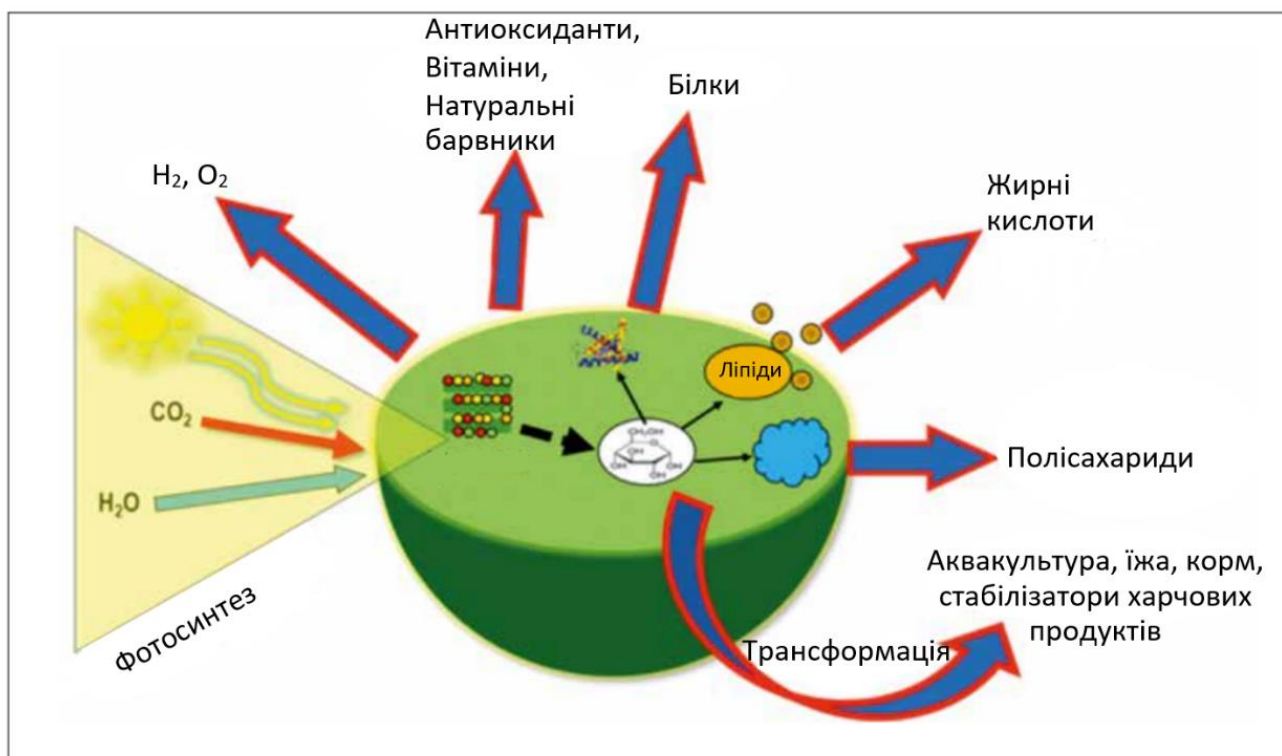


Рисунок 1.1 – Огляд можливих продуктів, які можна отримати з *Chlorella vulgaris* [18]

Виходячи з цього існують різні шляхи використання біомаси мікроводоростей або компонентів, отриманих з них (рис 1.2).

У сільському господарстві застосовують для підживлення рослин, птахів і тварин, в бджільництві і рибному господарстві. Кормову добавку використовують у вигляді суспензії та пасти, в окремих випадках – у вигляді порошку та гранул. Включення хлорели в кормові раціони зумовлює зростання м'ясної продуктивності до 35%, молочної продуктивності - до 20%, яйценосності курей – до 30%, а також знижує витрати кормів на 10-15%. Цінність зеленого біокорму ще в том, що він спричиняє підвищення резистентності до різних захворювань. Також суспензія хлорели позитивно впливає на гусениць тутового шовкопряда, прискорюючи їх ріст, та збільшуючи його життєдіяльність [19].

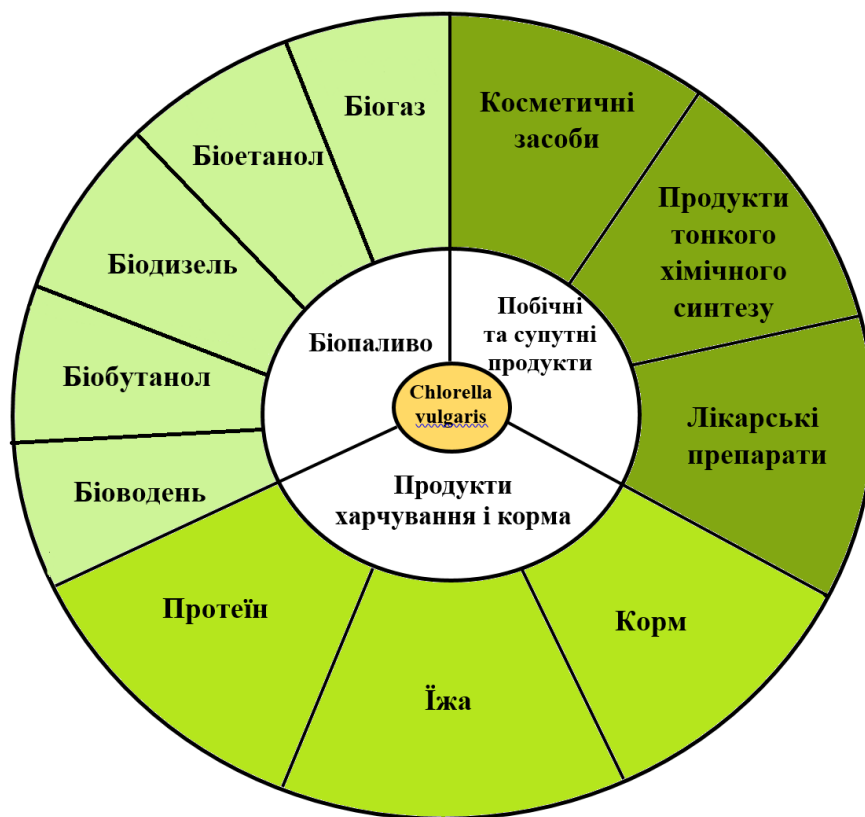


Рисунок 1.2 – Використання біомаси *Chlorella vulgaris*, або компонентів, отриманих з неї [18]

Широко хлорелу використовують і в харчовій промисловості. В Японії практикують отримання з хлорели порошку, який є висококалорійним продуктом, багатим на поживні речовини, його додають до муки та використовують для приготування хлібобулочних виробів. В харчовій та косметичній промисловості в якості натурального барвника широко використовують хлорофіли хлорели. [20].

Проведено багато досліджень, результати яких свідчать, що використання мікроводоростей дає високу ефективність при лікуванні багатьох захворювань, зумовлених порушенням роботи ендокринної та імунної систем, а глікопротеїди та певні компоненти клітинної стінки пригнічують ріст злоякісних пухлин. Каротиноїди пригнічують утворення вільних радикалів, тому їх розглядають в якості антиоксидантів, оскільки подвійні зв'язки в структурі їх молекул здатні до

зв'язування синглетного кисню. Серед пігментів мікроводоростей особливу увагу заслуговують фікобіліпротеїни, які застосовують в якості компонентів протизапальних засобів. Також використання цих пігментів практикують в імунофлуоресцентній діагностиці, де вони виступають в якості міток. Хлорела має бактерицидні властивості і здатна нейтралізувати дію отруйних речовин. Продукти переробки хлорели використовують також в косметології в якості барвників, кремів, емульгаторів, гелеутворювачів і миючих засобів [21].

Були проведені дослідження, які показали можливість використання хлорели для освоєння космосу. Вона може виступати ланкою в замкнутих за газом та водою екосистемах, тобто забезпечити біологічну регенерацію повітря та відтворення їжі за рахунок своєї метаболічної активності. Встановлено, що хлорела здатна забезпечувати людину киснем, поглинаючи вуглекислий газ та утилізуючи її продукти життєдіяльності, практично необмежено довго, але при цьому людина не може повністю поглинути всю біомасу хлорели, що синтезується [16].

Останнім часом велику увагу приділено ще одному аспекту застосування мікроводоростей в господарському житті людини - екологічному. Левова частка споруд для очищення стічних вод засновані на біологічному методі очистки. Беручи до уваги економічну ефективність, вважається, що для очищення стічних вод підприємств харчової промисловості, птаховабрик та тваринницьких ферм, перспективним організмом є хлорела. Мікроводорості здатні не лише до засвоєння органічних речовин та біогенних елементів, вони також виділяють кисень, збагачуючи ним водне середовище, що сприяє окисненню активним мулом забруднюючих речовин, таким чином інтенсифікується процес очищення стічних вод від різноманітних забруднень. Культивуєючи мікроводорості в стічних водах, можна як здійснити біологічне очищення стічних вод, так і отримати біомасу, багату білками, вітамінами, елементами тощо. Відомо, що комплекс бактерій з мікроводоростями здатен до деструкції таких ксенобіотиків, як мазут, продукти органічного синтезу, які потрапляють в гідросферу в результаті антропогенної

діяльності. Розраховано, що очищення стічних вод біологічними методами, в першу чергу, за допомогою водоростей, коштує в 100 разів дешевше, ніж фізико-хімічними, при цьому за рахунок механічного очищення з води видаляється до 30%, фізико-хімічної - до 40%, а біологічної - до 80% органічних забруднень [22].

Існує практика застосування хлорели для очищення газових викидів. Вуглекислий газ, а також оксиди азоту та сірки є основними компонентами димових газів, що зумовлюють глобальне потепління та є причиною кислотних дощів відповідно. Оскільки мікроводорості – автотрофні фотосинтезуючі організми, то вони можуть ефективно споживати вуглекислий газ. Нітроген та Сульфур є макроелементами, тому оксиди даних елементів також в певних концентраціях споживаються мікроводоростями, не пригнічуючи їх росту. Так, були проведені досліді з біоремедіації димових газів, що утворюються з коксової печі металургійного заводу, з'ясувалося, що середня ефективність видалення CO_2 з димового газу може досягати 60%, а ефективність видалення NO і SO_2 підтримується на рівні приблизно 70% і 50% відповідно [23].

У результаті зростання навантаження на сільськогосподарські землі та значного антропогенного впливу на біосферу, зокрема ґрунтовий покрив, гостро стоїть проблема відновлення родючості земель. Для вирішення даного питання ефективно використовувати біологічні методи. Так, великим потенціалом володіють мікроводорості, які дозволяють поповнювати запаси органічних речовин, що в свою чергу веде до підвищення врожайності сільськогосподарських рослин. Мікроводорості також можна використовувати як індикатори стану ґрунтів для вивчення механізму дії пестицидів, гербіцидів та фунгіцидів, при випробуваннях різноманітних добрив та визначення потреб в них. Окрім того, мікроводорості можуть бути модельними об'єктами при вивченні фітотоксичної дії хімічних сполук [16].

Третє покоління біопалива, в якості сировини якого використовують мікроводорості з підвищеним вмістом ліпідів, вважається найперспективнішим

видом біопалива. Мікроводорості у десятки та сотні разів за теоретичним виходом перевищують пальмову та рапсову олії відповідно. Основними перевагами мікроводоростей вважається: незалежність виробництва від сезонності, більший вихід олії з одиниці площі та висока швидкість росту, компактне розміщення виробництва. Використання мікроводоростей в якості сировини для отримання енергоносіїв не викликає продовольчу небезпеку, на відміну від сільськогосподарських культур, оскільки перші не конкурують за орні землі.

Існує багато способів для переробки біомаси мікроводоростей в біопаливо, які можна розділити на наступні три основні напрями:

- 1) використання трансформації екстрактів мікроводоростей (наприклад, ліпідів, вуглеводів) в біопаливо (наприклад, біодизель, біоетанол);
- 2) перетворення усієї біомаси в біопаливо;
- 3) використання мікроводоростей для виробництва молекул палива (наприклад, етанол, водень, метан, алкани) в результаті їх життєдіяльності [8].

На сьогоднішній день віддається перевага до комплексного використання біомаси хлорели (рис. 1.3).

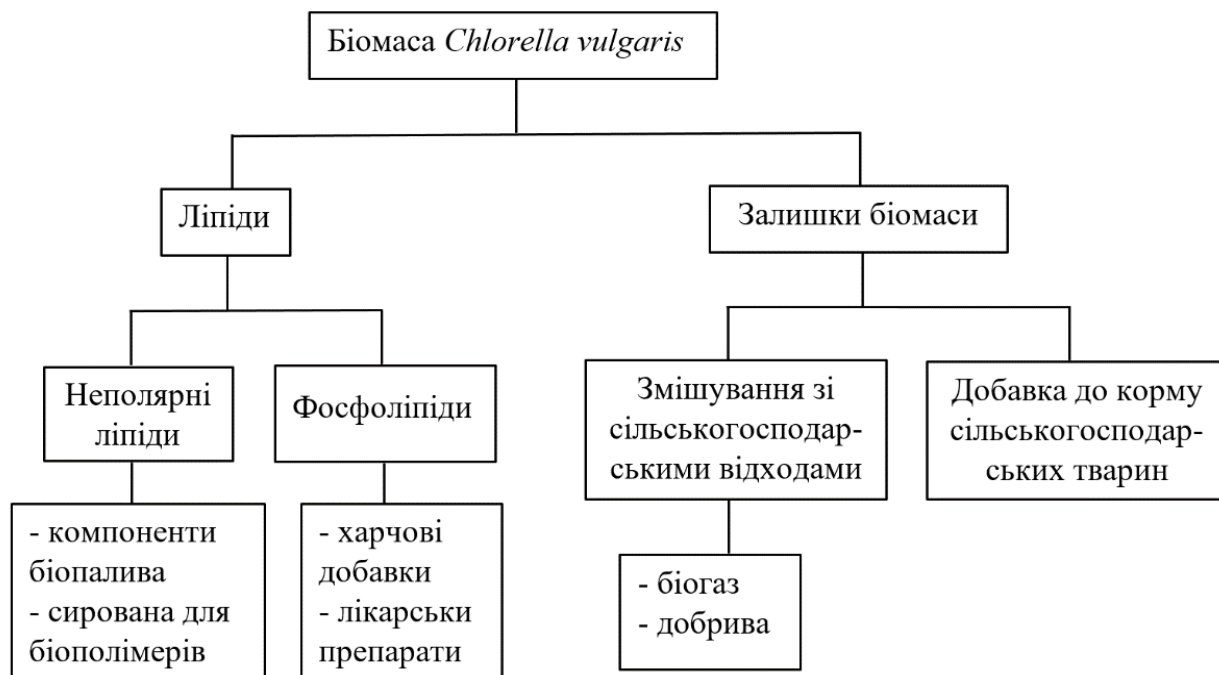


Рисунок 1.3 – Схема комплексного використання біомаси *C. vulgaris* [8]

Найбільш простим та найменш затратним при виробництві видом біопалива на даний момент є біогаз. Тому не дивно, що саме біогаз виробляється у великій кількості в багатьох країнах світу.

Кількісний та якісний склад біогазу залежить від співвідношення хімічних елементів у субстраті та технологічних параметрів анаеробного збродження. Хоча відсоткова доля сірководню в біогазі невелика (0,5-2%), він є найбільш шкідливим компонентом біогазу, який необхідно усувати при будь-якому подальшому використанні біогазу (таблиця 1.1).

Таблиця 1.1 – Вимоги очищення біогазу для різних потреб [24]

Спосіб використання біогазу	Необхідність у видаленні (+) компонентів			
	Тверді частинки	H ₂ S	CO ₂	H ₂ O
Топка котельних агрегатів та сушильних установок	+	+	-	-
Побутові газові плити	+	+	-	-
Стаціонарні газові двигуни	+	Часткове видалення	-	-
Паливо для автомобільних двигунів	+	+	+	+
Підживлення мережі природного газу	+	+	+	+

Сірководень токсичний, має неприємний запах, за наявності вологи та особливо в комбінації з вуглекислим газом спричиняє корозію металевих обладнання, при згоранні утворює оксид та діоксид сірки, які, взаємодіючи з парою води, перетворюються у сульфідну та сульфатну кислоти, які мають високу корозійну активність. H₂S в концентраціях 1000-3000 ppm може викликати миттєву смерть. Це пов'язано з реакцією між H₂S і ферментами в крові, що пригнічує клітинне дихання. Спалювання біогазу, що містять H₂S у високих концентраціях,

збільшує викиди двоокису сірки (SO_2), що зумовлює кислотні дощі і призводить до серйозних пошкоджень рослинності та споруд.

Таким чином, біогаз потребує очищення з двох основних причин; перший - підвищити теплотворну здатність продукту (переважно стосується CO_2), а другий - знизити ймовірність пошкодження обладнання та негативний вплив на здоров'я людини та навколишнє середовище (дія H_2S) [25].

На сьогодні розроблені та доступні різні технології для очищення біогазу; вони включають абсорбцію хімічними розчинниками, фізичну абсорбцію, кріогенну сепарацію, мембранне розділення і біологічні або хімічні методи. Однак дані фізико-хімічні методи очищення є не тільки високовартісними, оскільки вони потребують великої кількості енергії, допоміжних матеріалів та реагентів, але й генерують значний об'єм відходів і стічних вод, які забруднюють навколишнє середовище. Крім того, вуглекислий газ, який відділяється в процесі очищення біогазу, зазвичай випускається в довкілля, тим самим сприяючи підвищенню вмісту парникових газів в атмосфері [2].

Таким чином значний інтерес представляють біологічні методи очищення, насамперед з використанням мікроорганізмів, що володіють фотосинтетичною активністю - мікроводоростей, які дозволяють в певній мірі усунути вищенаведені проблеми. Очищення біогазу за допомогою мікроводоростей передбачає поглинання домішок, що містяться в біогазі, та їх трансформацію в біомасу, яку далі можна використовувати в різноманітних цілях.

1.6 Фактори, які впливають на життєдіяльність *Chlorella vulgaris*

Життєдіяльність хлорели залежить від багатьох факторів, найбільш важливими з яких є наявність поживних речовин, температура, світло та рН. Ці фактори впливають на ріст хлорели та метаболізм клітин, що в свою чергу зумовлює їх особливий хімічний склад [7].

1.6.1 Вплив температури

Температура впливає на ферментативні реакції, систему клітинної мембрани та інші характеристики. *C. vulgaris* добре росте при високих температурах, 26-30 °С; погано росте або ж зовсім не росте при 5-10 °С. Причому змінний температурний режим 26-30 °С більш сприятливий для росту хлорели, ніж постійні температури 26 °С або 30 °С [26]. Тому при культивуванні хлорели допускається коливання температури в межах 4-5 °С. Криві росту для *C. vulgaris*, що культивувалися при різних температурах, представлені на рис. 1.4.

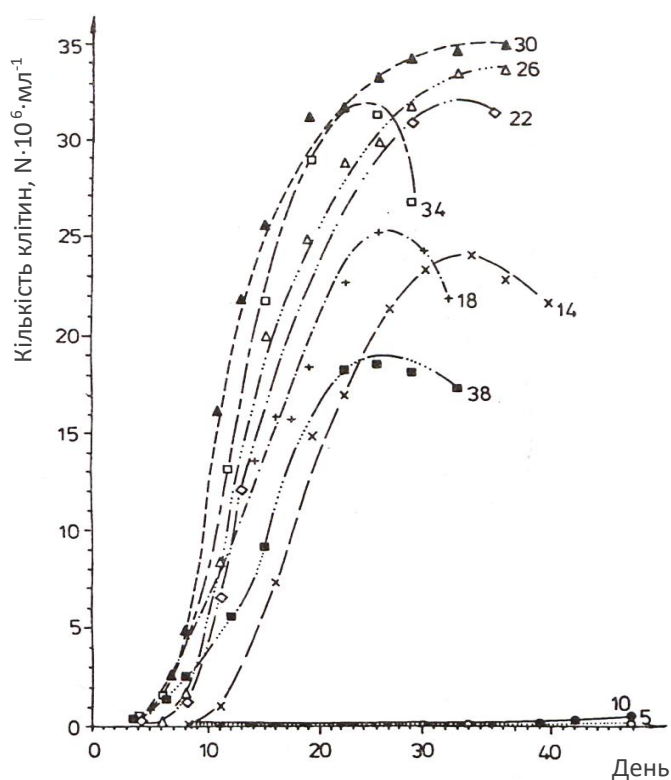


Рисунок 1.4 – Криві росту *C. vulgaris* в залежності від температури [27]

Температура впливає не тільки на ріст мікроводоростей, але й на їх морфологію: зі збільшенням температури спостерігається зменшення об'єму клітин. Зростання температури призводить до інтенсифікації метаболізму; цей взаємозв'язок пов'язан з біологічним принципом: чим менше організм, тим

активніше метаболізм; іншими словами, швидкість метаболізму на одиницю об'єму або одиницю ваги зменшується зі збільшенням розмірів організму [27].

Температура буде також впливати на хімічні процеси в культуральному середовищі. Так, буде посилюватися гідроліз солей, зокрема Na_2S : оскільки даний процес ендотермічний, то відповідно до принципу Ле Шательє при підвищенні температури рівновага ендотермічних процесів зміщується в бік утворення продуктів, отже в культуральному розчині буде збільшуватися концентрація сірководню, який є інгібітором [28]. Таким чином, вплив температури на ріст *C. vulgaris* має неоднозначний характер .

1.6.2 Вплив рН

Показник рН є важливим параметром, оскільки він впливає на утворення комплексів різної розчинності і токсичності, на сорбцію металів на стінках клітин, на продуктивність фотосинтезу. З іншого боку, параметр рН може впливати на ріст хлорели через збільшення абсорбції неорганічних газів.

Оптимум рН для росту *C. vulgaris* знаходиться в нейтральному та слаболужному діапазоні, 7.5-8.0. Кислотні (3.0-6.2) і лужні (8.3-9.0) значення рН уповільнюють ріст даної мікроводорості. Для підтримки внутрішньоклітинного нейтрального рН в кислому середовищі потрібні додаткові витрати енергії для відкачування протонів з клітини, що може бути причиною нестачі АТФ для компенсації енергетичних потреб організму [29].

Проте в інших дослідженнях було отримано інші результати: *Chlorella vulgaris* може рости в широкому діапазоні рН (4-10), і велика продуктивність біомаси досягається в лужному середовищі (рН = 9-10.5) [30].

У дослідженні [31] взагалі було досягнуто найвищу оптичну густину, кількість клітин і найбільший вміст хлорофілу *a* при рН=12 в порівнянні з контролем, тобто рН=7 (рис. 1.5).

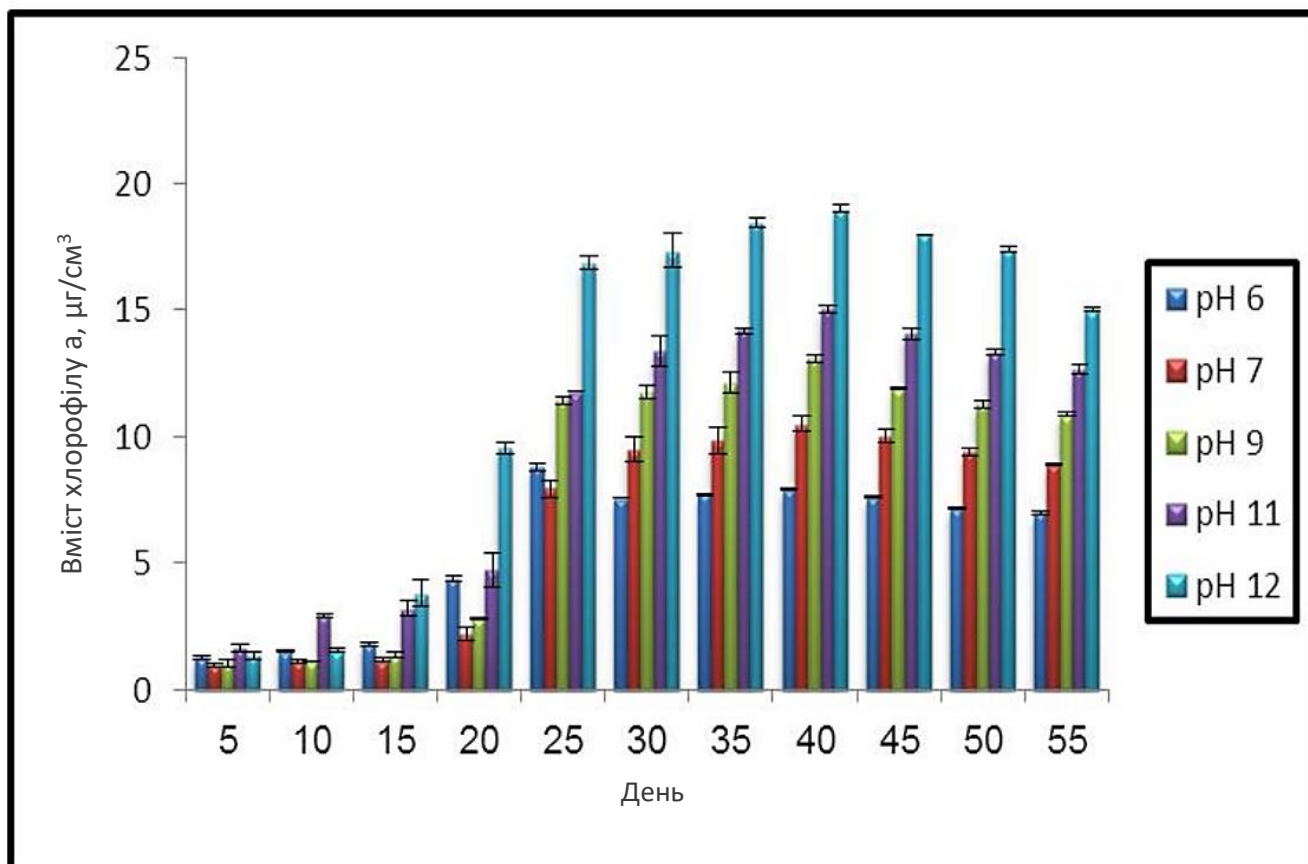


Рисунок 1.5 – Графік залежності росту *Chlorella vulgaris* (вмісту хлорофілу) від різних значень pH [31]

Результати дослідів [32] показали, що pH середовища є найбільш важливим фактором, що впливає на поглинання сполук, зокрема сірки, тому рівень токсичності сульфідів залежить від pH. Було встановлено, що поглинання S (VI) клітинами хлорели не змінюється з pH, тоді як поглинання S (IV) і S (II) збільшується зі зменшенням pH. В цих випадках незаряджені молекулярні форми $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{H}_2\text{S (aq)}$ швидко дифундують через плазмалему, яка є непроникною для заряджених іонів.

1.6.3 Вплив факторів мінерального живлення

Серед факторів, які визначають продуктивність культур мікроводоростей, значну роль відіграють умови мінерального живлення. Від них залежить, не тільки

інтенсивність росту, але й напрямок біосинтезу культури [33]. Для культивування хлорели необхідно включити в склад поживного середовища наступні мінеральні елементи, які можна поділити на 2 групи: до першої входять такі макроелементи, як N, K, P, K, Mg, S; до другої — основні фізіологічно необхідні мікроелементи — Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B.

Нітроген входить до складу амінокислот, білків, протеїнів, ферментів тощо. Забезпеченість клітин цим елементом визначає процеси біосинтезу. Дефіцит Нітрогену веде до зниження продуктивності біомаси, зменшення кількості хлорофілу в клітинах, збільшується частка вуглеводів та ліпідів [34].

Сульфур входить до складу сірковмісних амінокислот, а отже й до таких життєво важливих сполук як білки, ферменти тощо. При нестачі Сульфуру відбувається збільшення розмірів клітин та руйнування хлорофілу. Характерними рисами сірчаного голоду є зменшення вмісту білку та різке зростання ліпідів при постійному рівні вуглеводів [34].

За участю Фосфору відбувається азотний та вуглеводний обмін. Фосфор входить до складу таких важливих компонентів клітини, як нуклеїнові кислоти, фосфоліпіди, АТФ. При нестачі Фосфору клітини характеризуються збільшенням частки вуглеводів та ліпідів, погіршуються процеси асиміляції [34].

Хоча Калій не входить до складу таких важливих сполук, як білки, вуглеводи та ліпіди, але він необхідний для нормального синтезу даних сполук. При нестачі Калію у мікроводоростях інгібується фотосинтез та підсилюється дихання, спостерігається хлороз [35].

Роль Магнію в живленні фотоавтотрофів дуже суттєва, оскільки він входить до складу хлорофілу. Зв'язаний з органічними речовинами, магній бере участь в багатьох ферментативних процесах. Вважається, що його дефіцит сповільнює синтез білку та порушується обмін нуклеїнових кислот [35].

При нестачі Натрію пригнічується ріст мікроводоростей, знижується концентрація хлорофілу та вміст органічного азоту в клітинах [35].

В життєдіяльності мікроводоростей велике значення мають незамінні в специфічних фізіологічних функціях мікроелементи. Залізо входить до складу активних центрів таких ферментів, як каталаза, пероксидаза, цитохромоксидаза, а також залізовмісних білків (фередоксин, залізофлавопротеїди), за участю яких відбуваються окисно-відновні реакції. Манган впливає на ріст та розвиток мікроводоростей, а також бере участь у фотохімічних процесах. Його нестача не тільки гальмує ріст, але й змінює морфологію клітин. Мідь бере участь в процесах фотосинтезу, впливає на фоторедукцію та входить до складу цитохромоксидази. Цинк, як і залізо, входить до складу активних центрів багатьох ферментів, що регулюють білковий, вуглеводний, фосфорний обміни, інтенсивність фотосинтезу, біосинтез нуклеїнових кислот та окисно-відновний потенціал у клітинах. Молібден необхідний для фіксації атмосферного азоту та відновлення нітратів. Кобальт входить до складу вітаміну B₁₂, кобаламідних коензимів. Бор збільшує число клітин та вихід біомаси, здійснюючи помітний вплив на ріст клітин після поділу [34].

1.7 Роль Сульфуру в життєдіяльності клітин *Chlorella vulgaris*

Як і у всіх живих організмів Сульфур є макроелементом, що необхідний для нормальної життєдіяльності. Він входить до складу сірковмісних амінокислот, пептидів, білків, ферментів та багатьох інших органічних сполук клітини. Деякі сполуки Сульфуру беруть участь в окисно-відновних реакціях, біосинтезі та метаболізму різних речовин. Зокрема важлива роль Сульфуру у визначенні властивостей та структурних перетворень білкової молекули.

Фізіологічна роль Сульфуру в клітинах хлорели пов'язана з процесами поділу клітин. При нестачі Сульфуру з'являються клітини діаметром 7 мкм, які не зустрічаються в нормальній популяції *Chlorella vulgaris*. Це свідчить про ураження механізму клітинного поділу при збереженні біосинтезу. Спостерігається аглютинація клітин, значно зменшується в них вміст хлорофілу та зростає виділення метаболітів у середовище [35].

Також, встановлено, що при культивуванні дрібних, активно фотосинтезуючих дочірніх клітин в поживному середовищі без Сульфуру спостерігається незначне збільшення розміру клітин та поділ ядра на 2 дочірніх (рис.1.6), але далі клітина не розвивається [35].

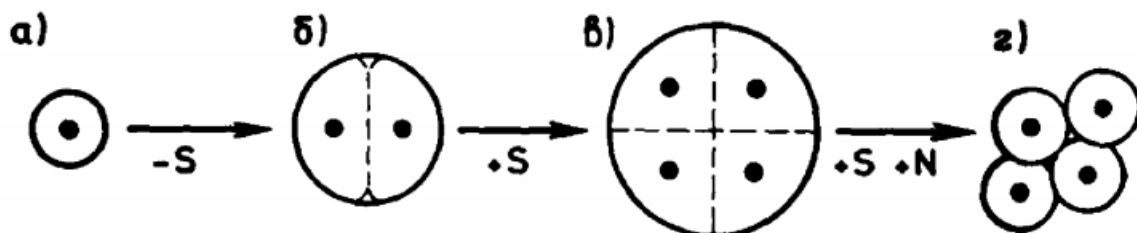


Рисунок 1.6 - Порушення життєвого циклу хлорели при нестачі Сульфуру [35]
 а – молода, активно фотосинтезуюча клітина; б – затримка розвитку в клітині на стадії поділу при нестачі Сульфуру; в – збільшення клітини в розмірах та подальший поділ ядра без виходу автоспор після додавання Сульфуру в середовище; г – вихід дочірніх клітин після додавання Сульфуру та Нітрогену.

Якщо голодуючі за Сульфуром клітини перенести на середовище, що містить тільки Сульфур, вони ростуть та збільшуються в розмірах, відбувається синтез ДНК та подальший поділ ядра, але не клітини. При введенні в середовище разом із Сульфуром Нітроген спостерігається поділ клітини з виходом автоспор.

Нестача Сульфуру у хлорелі проявляється при зменшенні надходження її до 3,3 г на 1 кг біомаси, що продукується (суха речовина) та нижче. Проте швидкість біосинтезу знижується не одразу при недостатній подачі Сульфуру в поживне середовище, а розвивається поступово на другу добу, тобто на третьому-четвертому подвоєнні біомаси. Нестача Сульфуру в середовищі є стресовим фактором, що зумовлює накопичення в клітинах ліпідів на противагу вуглеводів. Однак забезпечення таких клітин одним Сульфуром не нормалізує їх метаболізм. Це можливо лише при одночасному внесенні в середовище сполук сірки та азоту [35].

Концентрація Сульфуру в межах 20-60 мг/дм³ забезпечує нормальний ріст хлорели. Хлорела витримує високі концентрації Сульфуру в середовищі. При нормальних концентраціях інших елементів живлення зростання концентрації Сульфуру (у формі (NH₄)₂SO₄) до 1000 мг/дм³ не призводить до зниження продуктивності культури, якщо рН підтримується в оптимальних межах [7].

1.7.1 Метаболізм Сульфуру в клітинах

Більшість мікроводоростей засвоюють Сульфур в окисненій формі – тобто у формі сульфатів. Подальший шлях сульфатів у клітині – включення їх в загальний метаболізм - починається з відновлення їх до сульфгідрильного рівня. Проте певні види мікроводорості *Chlorella* здатні утилізувати відновлені форми сполук сірки – сірководень та сульфід [35]. Але у більшості випадків відновлені форми сульфуру чинять інгібуючу дію на клітини мікроводорості (рис.1.7) [36].

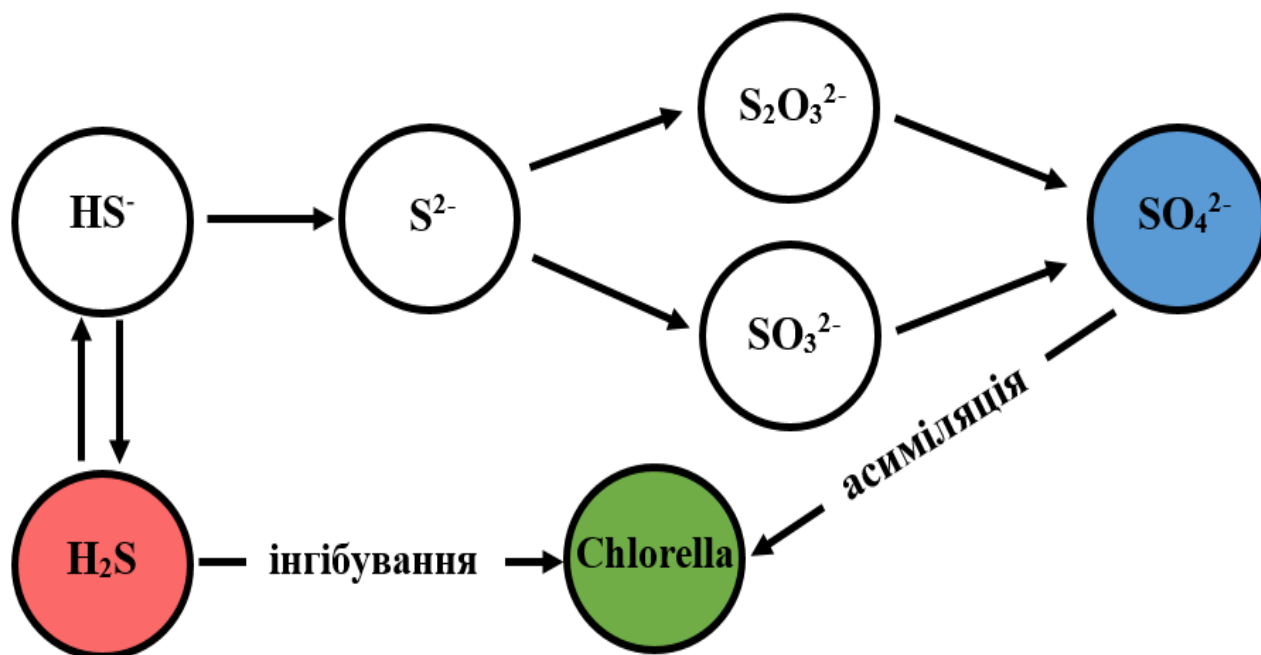


Рисунок 1.7 – Схема перетворення сполук сірки та їх впливу на *Chlorella vulgaris* [36]

Було проведено дослідження [37], у ході якого встановили, що спорідненість та здатність до поглинання сульфату збільшуються протягом декількох годин після зменшення концентрації сульфату; і зменшуються при поповненні запасів сульфату, що вказує на те, що такі швидкі зміни дійсно відбуваються в природному середовищі, тому має існувати ефективна система сприйняття і сигналізації, щоб індукувати гени, які відповідають за транспорт сульфату. Сульфатні транспортери є складовими мембранних білків, які сприяють сульфат /H⁺ котранспорту.

Таким чином, з цього можна зробити висновок про те, що, як і у багатьох інших еукаріот, зелені водорості здатні індукувати системи з високою афінністю і високою пропускнуою здатністю для транспорту сульфату в плазмалемі у відповідь на зменшення S. Цей транспортний механізм не є абсолютно залежним від світла та підтримується протонним градієнтом, що генерується АТФ-азой, розташованої в плазмалемі.

Сульфат після поглинання в цитоплазму транспортується в пластиди або, якщо присутній в надлишку, зберігається у вакуолях. Щоб відбулося відновлення хімічно дуже стабільний сульфат-аніон активується АТФ до 5'-аденілсульфату (APS), що каталізується АТФ-сульфурілазою (АТФ-S). APS потім відновлюється APS-редуктазою до сульфіту, отримуючи два електрона з глутатіону. APS-редуктаза є первинним сайтом регуляції шляху асиміляції сульфатів у рослин і водоростей. Цікаво, що у деяких водоростей активність APS-редуктази в 400 разів вище, ніж зазвичай спостерігається у рослин, тісно пов'язана зі швидкістю зростання і залежить від доступності. Сульфіт відновлюється до сульфіді за допомогою сульфітрeredуктази, ферменту зі структурною і функціональною подібністю з нітритредуктазою. Отриманий вільний сульфід одразу включається в цистеїн, що є першою стабільною органічною сполукою сірки під час асиміляції [38].

Проте при певних умовах у клітинах може відбуватися процес, оборотний відновленню сульфату, - окиснення органічних сполук сірки до неорганічного

сульфату. Таким чином, обмін Сульфуром в клітинах, який зазвичай починається з сульфату, може закінчуватися новоутворенням його як кінцевого продукту обміну. У багатьох випадках така направленість сірковмісних сполук може бути проявом захисної реакції на несприятливі умови. Наприклад, засолення та утворення в клітинах неорганічного сульфату запобігає накопиченню токсичних первинних продуктів окиснення сірковмісних амінокислот. Імовірно, в культурі хлорели рівень забезпеченості Сульфуром та процеси його перетворення в клітинах можуть впливати на стійкість в певних екстремальних умовах [35].

1.7.2 Вплив різних сполук сірки на ріст *Chlorella vulgaris*

Види зеленої мікроводорості роду *Chlorella* здатні рости на різноманітних джерелах Сульфуром, таких як меркаптиди, дисульфіди, тіоефіри, сульфінатові та сульфокислоти, сульфоксиди тощо. Даний факт свідчить про те, що дані мікроводорості можуть відігравати важливу роль при детоксикації сполук Сульфуром біотичного та абіотичного походження.

Було досліджено ріст мікроводоростей роду *Chlorella* на неорганічних сірковмісних речовинах та їх вплив на активність ферментів [37]. Зразки, які культивувались на сульфаті натрію, показали добрий ріст, який аналізували за вмістом хлорофілу в біомасі. Цистеїнсинтаза мала більш високу питому активність, ніж ферменти активації сульфату (АТФ-сульфурилази и APS-сульфотрансферази). Зразки, які культивувались при нестачі Сульфуром, характеризувались високою активністю ферментів, пов'язаних з нормальним метаболізмом Сульфуром, за виключенням ферментів активації сульфату, які мали більш низьку активність після 5-денного росту в умовах серйозного голодування. Відновлені неорганічні сполуки сірки виявилися поганим джерелом Сульфуром для росту; ферментативні активності були аналогічні тим, які були виявлені в умовах сульфатного голодування. Ріст на окиснених сполуках сірки, таких як тіосульфат і тетратіонат, був схожим з ростом

на сульфаті. Елементарна сірка викликала підвищення активності цистеїнсинтази і тіосульфатредуктази.

Таким чином, підвищена активність ферментів активації сульфату, цистеїнсинтази і тіосульфатредуктази може бути пояснена обмеженою доступністю сполук сірки для росту, в той час сульфатне голодування може бути розпізнано за зменшенням активності ферментів активації сульфату. Якщо сполуки сірки повільно метаболізується, можна очікувати прояви симптомів дефіциту Сульфуру. Також важливим фактором, ймовірно, є ступінь відновлення сполук сірки. Так, окиснення сульфідів до сульфату відбувається повільно, що в деяких випадках призводить до накопичення сірки з нульовою валентністю. Це може привести до сигналів дефіциту Сульфуру, навіть якщо в середовищі наявні відновлені сполуки сірки [39].

Дослідження [40] показали токсичність сірководню для різних груп організмів, таких як ракоподібні, водорості, риби та інші хребетні. H_2S є летючим, а концентрація H_2S в розчині сильно залежить від таких параметрів, як рН, вміст кисню і солі. Існують три форми сірководню, які природним чином утворюються у навколишньому середовищі: H_2S , HS^- і S^{2-} . Багато авторів опублікували дослідження, що показують, що токсичність в основному пов'язана з сірководнем (H_2S), деякі автори взагалі не спостерігають різниці між трьома формами сірководню. Більшість авторів ідентифікують основну причину токсичних ефектів як безпосереднє зв'язування сірководню з ферментом цитохром-с-оксидазою або іншими метало- та дисульфідовмісними білками. Інші припустили, що інгібування мітохондріального дихання зумовлено відкриттям пор, збільшенням мітохондріальної проникності, що призводить до зменшення внутрішньоклітинних концентрацій аденозинтрифосфату. Через значний pK_s близько 7,01 внутрішньоклітинні концентрації H_2S і HS^- будуть однаково високими, так що важко стверджувати, що один або інший (сірководень або сульфідні аніони) є причиною токсичного ефекту в клітинах. Таким чином, можна однаково говорити

про токсичність HS^- , H_2S або їх спільної дії. Однак через те, що HS^- заряджений, малоймовірно, що він буде легко дифундувати в клітини. Навпаки, H_2S більш здатний проникати через клітинні мембрани, тому інгібування цитохром-с-оксидази або інші ефекти, які спостерігаються в клітинах, будуть залежати від позаклітинної концентрації H_2S , а не HS^- [39].

У роботі [41] було досліджено приріст біомаси за одночасного введення CO_2 та H_2SO_4 або Na_2SO_3 . Показано, що збільшення концентрації Сульфуру в середовищі до 0.44 г/дм^3 за використання сульфіту натрію підвищує продукування біомаси на 15% і не викликає відхилення значень рН від оптимального діапазону.

Культивуючи *Chlorella vulgaris* з додаванням H_2SO_4 як джерела Сульфуру, було отримано результати, які представлені на рис. 1.8, який ілюструє те, що підвищені концентрації сульфатної кислоти (0.29 ммоль/дм^3 , 0.57 ммоль/дм^3 , 0.85 ммоль/дм^3 та 1.13 ммоль/дм^3) не інгібують ріст клітин, а навпаки - спричиняють підвищення приросту біомаси у порівнянні з контролем, причому найбільше стимулює ріст найбільша концентрація H_2SO_4 , що складає 1.13 ммоль/дм^3 .

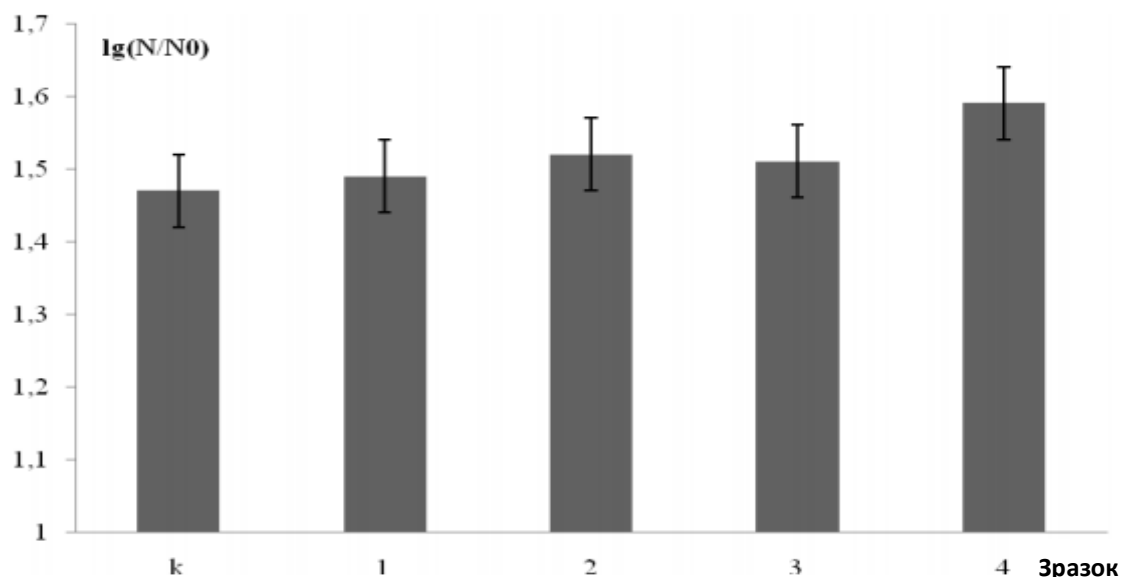


Рисунок 1.8 – Графік залежності приросту біомаси *Chlorella vulgaris* від концентрації H_2SO_4 протягом 10-денного культивування [41];

k – контроль, без H_2SO_4 , 1 – $0.29 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$, 2 – $0.57 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$, 3 – $0.85 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$, 4 – $1.13 \text{ ммоль/дм}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$

Культивуючи *Chlorella vulgaris* з додаванням Na_2SO_3 як джерела Сульфуру, було отримано результати, які представлені на рис. 1.9.

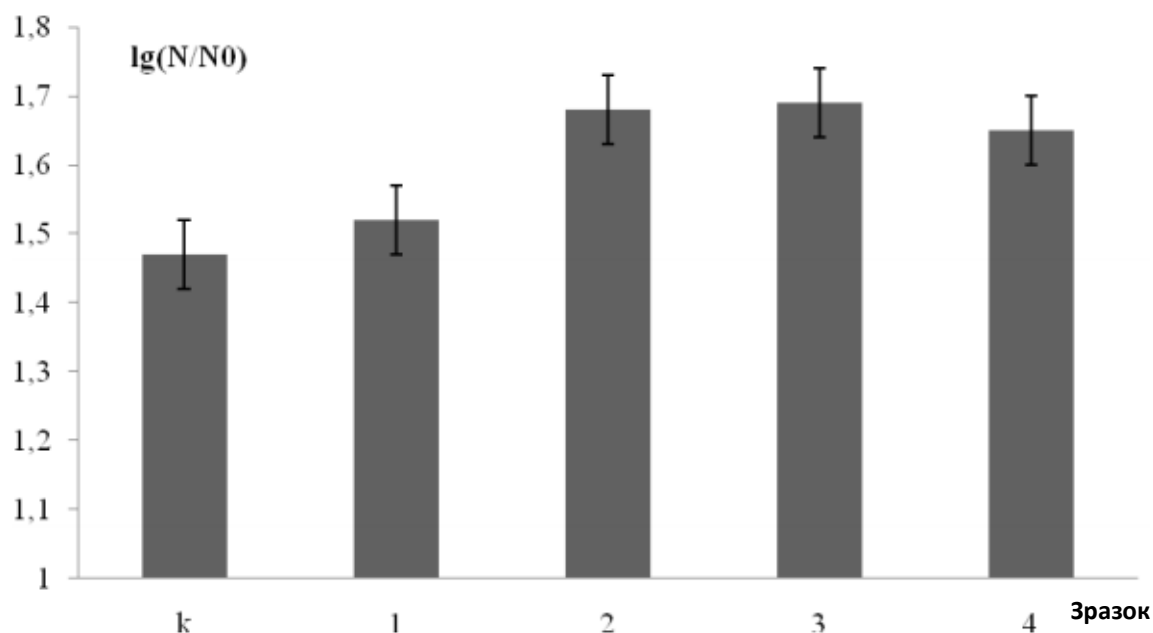


Рисунок 1.9 – Графік залежності приросту біомаси *Chlorella vulgaris* від концентрації Na_2SO_3 протягом 10-денного культивування [41];

k – контроль, без Na_2SO_3 , 1 – 0.5 ммоль/ дм³ Na_2SO_3 , 2 – 0.85 ммоль/ дм³ Na_2SO_3 , 3 – 1.2 ммоль/ дм³ Na_2SO_3 , 4 – 1.7 ммоль/ дм³ Na_2SO_3 .

Підвищення концентрації Na^+ призводить до підвищення солоності в культуральному середовищі і може бути інгібуючим фактором для мікроводоростей через вплив процесу осмотичної регуляції. При цьому відбувається накопичення малих молекул осморегулюючих сполук (таких як гліцерин, фітол, низькомолекулярні жирні кислоти). Але попереднє дослідження [42] показало, що введення в культуральне середовище додаткової кількості Na^+ -іонів (2.5 г/дм³) позитивно впливає на продукування біомаси мікроводоростей. Введення одночасно додаткової кількості як Na^+ , так і SO_3^{2-} (концентрація солі 1.7 г/дм³) позитивно впливає на ріст культури. Причому приріст біомаси у випадку використання сульфіту натрію в два рази більший, ніж у випадку використання

сірчаної кислоти. Це можна пояснити тим, що SO_3^{2-} окиснюється до SO_4^{2-} , що є асиміляційною формою для мікрободоростей, і відповідно збільшується кількість споживаного Сульфуру. Одночасно значення рН в цих зразках залишаються на оптимальному рівні для вирощених мікрободоростей *Chlorella vulgaris*. Таким чином, введення додаткової кількості Сульфуру (у формі сульфідів та сульфатів) в культуральне середовище позитивно впливає на ріст біомаси *Chlorella vulgaris*, оскільки такий підхід призводить до стимуляції синтезу білків і жирних кислот. Збільшується також кількість ферментів, які відіграють важливу роль в окисно-відновних і енергетичних процесах (утворення зв'язків між SH-групою ферментів і коферментами NAD і FAD, регуляція АТФ-синтетази тощо). Крім того, різні вітаміни і кофактори в клітинах мікрободоростей містять Сульфур (наприклад, біотин, тіамін, кофермент А, глітацин, ліпоєва кислота тощо), які беруть участь у регуляції різних шляхів метаболізму клітин.

1.7.3 Вплив Сульфуру на біосинтез хлорофілу

Хлорела росте та розвивається, постійно продукуючи хлорофіл та каротиноїди, що дозволяє підтримувати оптимальний функціонально-активний стан фотосинтезуючого апарату. Але його вміст змінюється в залежності від умов навколишнього середовища, зокрема від концентрації Сульфуру, оскільки він є макроелементом, що виконує критичну роль у біосинтезі пігментів [43, 44].

Було проведено багато дослідів [7, 8, 35, 42, 43], в результаті яких було встановлено, що при дефіциті Сульфуру уповільнюється біосинтез хлорофілів, спостерігається збільшення середнього розміру однієї клітини і руйнування хлорофілу, хлороз, інгібується фотосинтез. Сульфур є важливим компонентом фотосистеми (ФС) II, за його відсутності блокується синтез цистеїну або метіоніну і різко послаблюється біосинтез протеїну. Це призводить до нестачі протеїну D1, важливого для функціонування ФС II. У зв'язку з цим в умовах дефіциту Сульфуру

фотосинтез і дихання зменшуються навіть при наявності світла. Однак інтенсивність фотосинтезу знижується набагато швидше, ніж дихання.

Питання впливу підвищеної концентрації Сульфору на біосинтез хлорофілів висвітлено в літературі значно менше, ніж при його нестачі. Результати дослідження [45, 46] впливу підвищеної концентрації Сульфору показали, що застосування Сульфору у більш високих дозах мало більш позитивний вплив на синтез хлорофілів у порівнянні з більш низькими дозами Сульфору.

В іншому експерименті [47] було досліджено вплив сірковмісних солей (Na_2S , Na_2SO_3 , MgSO_4) підвищених концентрацій на ріст клітин *Chlorella vulgaris* (табл. 1.2).

Таблиця 1.2 – Вміст хлорофілів у клітинах *Chlorella vulgaris* [47]

№ з/п	Концентрація реагенту	Хл а/сух.ваги, мг/г	Хл б/сух.ваги, мг/г	Загальний вміст хлорофілу, мг/г сух.ваги
1	Контроль	10,24	5,51	15,75
2	Na_2S 0,1мМ/л	8,62	3,75	12,37
3	Na_2S 1мМ/л	10,08	3,66	13,74
4	Na_2S 10мМ/л	8,22	2,93	11,15
5	Na_2SO_3 0,1мМ/л	12,45	5,34	17,79
6	Na_2SO_3 1мМ/л	11,41	3,29	14,70
7	Na_2SO_3 10мМ/л	14,31	4,30	18,61
8	MgSO_4 1мМ/л	13,53	5,19	18,72
9	MgSO_4 10мМ/л	13,04	4,67	17,71
10	MgSO_4 100мМ/л	10,73	2,73	13,46

Вміст хлорофілу *a* значно більший у клітинах *Chlorella vulgaris*, які росли на середовищі з додатковим вмістом сульфіту натрію та сульфату магнію. Проте, як зазначили автори, вплив даних солей на клітини може проявлятися дією як катіона, так і аніона. Збільшення вмісту хлорофілу *a* у культурі, що росла на середовищі з концентрацією сульфіту натрію 10 мМ/дм³, можна пояснити впливом іонів натрію,

який призводить до зростання проникності біологічних мембран завдяки індукції натрієвих каналів; в свою чергу підвищена концентрація сульфідів і сульфат аніонів не чинять впливу на синтез хлорофілу *a*, оскільки мікроводорості потребують неорганічних сульфатів для синтезу амінокислот. Причому кисень, який вивільнюється при фотосинтезі, окиснює Сульфур в сульфід іоні до сульфату.

Невелике збільшення Mg^{2+} , який є структурним елементом хлорофілу, одночасно з концентрацією сульфат іонів позитивно впливає на біосинтез хлорофілу, оскільки іон магнію є одним з ключових елементів у будові пігменту. Усі досліджувані солі у всіх концентраціях чинили негативний вплив на продукування хлорофілу *b* (табл.1.2), який синтезується з хлорофілу *a*, оскільки клітина реагує на дію стресового фактору синтезом речовин, що адаптують клітину до змін умов навколишнього середовища і забезпечують максимальною кількістю енергії.

Найбільший вплив на накопичення хлорофілів у *Chlorella vulgaris* чинить сульфід натрію (пригнічується синтез хлорофілів від 12% до 46%). Це пояснюється утворенням нерозчинних сполук сульфідів металів (Fe, Mn, Zn), які беруть участь у біосинтетичних процесах та фотосинтезі [42].

1.7.4 Вплив Сульфуру на біосинтез ліпідів

Інтерес до ліпідів мікроводоростей обумовлений їх високим потенціалом в якості сировини для фармацевтичної, хімічної та харчової промисловості [48].

Ліпіди, які виконують важливі функції в живих організмах, можна розділити на дві групи: неполярні або нейтральні (ацилгліцерини, воскові ефіри і ін.) та полярні ліпіди (фосфо- і гліколіпіди). Полярні ліпіди є важливими структурними компонентами мембран клітини і органел. Окрім структурної функції, полярні ліпіди виконують сигнальну функцію. Серед нейтральних (неполярних) ліпідів триацилгліцерини (ТАГ) є найбільш широко поширеною групою запасних речовин, що легко залучаються в катаболізм для отримання необхідної енергії.

При стресових умовах, зокрема при дефіциті елементів мінерального живлення, у тому числі й Сульфур, в мікроводоростях накопичуються саме нейтральні жири, причому збільшується частка насичених жирних кислот. Однак такі стресові умови перешкоджають поділу клітин і уповільнюють ріст культури, тобто зменшується накопичення біомаси. Введення ж додаткової кількості Сульфур в культуральне середовище позитивно впливає на ріст біомаси *Chlorella vulgaris*, оскільки такий підхід призводить до стимуляції синтезу білків і жирних кислот [49].

Результати досліджень [50] показують, що послідовне накопичення крохмалю і ліпідів у *Chlorellaceae spp.* є відповіддю на дефіцит Сульфур: вміст крохмалю збільшився в 1.5-2.7 рази, а вміст нейтральних жирів - в 1.5-2.4 рази в умовах дефіциту Сульфур, ніж в умовах його достатньої кількості.

1.8 Типи фотобіореакторів

Фотобіореактором називають такий апарат, у якому відбувається культивування фотосинтезуючих мікроорганізмів. У таких конструкціях дотримується оптимальний температурний режим, процеси підводу та відводу газових та рідких потоків, контролюється склад поживного середовища і умови всередині фотобіореактора. Закрита конструкція, дотримання та можливість регулювання спеціальних умов дозволяють отримати у декілька разів більший вихід цільового продукту у порівнянні з відкритими ємностями.

Залежно від конструкції, виділяють наступні типи фотобіореакторів: бульбашкові, газліфтні (аерліфтні), пласкопаралельні, трубчасті.

У бульбашкових та аерліфтних фотобіореакторах водне середовище перемішується газом, що надходить. Проте ефективність перемішування в них різна, що й впливає на величину періоду циркуляції рідини в об'ємі, тобто середню тривалість циклів світло-темрява для кожної клітини. Для бульбашкових фотобіореакторів дана величина дорівнює 1-4 с, а для газліфтних – 10-100 с.

Барботування повітряно-газовою сумішшю забезпечує як перемішування, так і насичення середовища вуглекислотою, тому для збільшення поверхні бульбашок, а отже й поверхні контакту фаз, необхідно зменшити розмір бульбашок. Це досягається пропусканням газу крізь перфоровані пластини.

Бульбашкові колонии часто використовують для проведення біотехнологічних процесів оскільки мають багато переваг: простота конструкції, низькі витрати на обслуговування та утримання, високі швидкості масо- та теплопередачі.

У газліфтних фотобіореакторах газ подається в нижню частину резервуару, який обладнаний внутрішньою трубкою (ліфтом). Таким чином біореактор розподіляється на зону, де присутній газ, та зону, без газу. Такий розподіл зон зумовлює вертикальний циркуляційний рух культуральної суспензії (рис. 1.10).

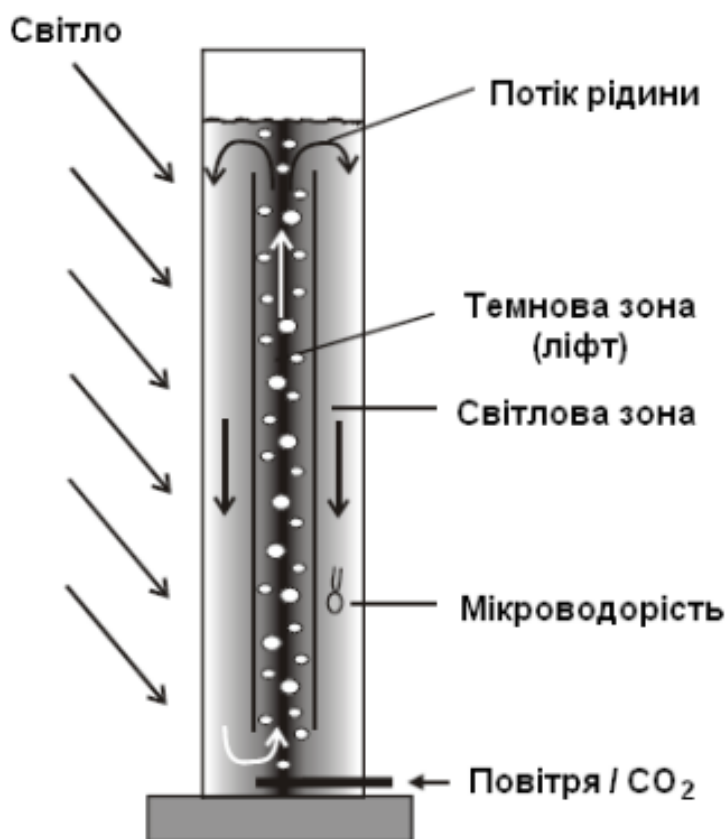


Рисунок 1.10 – Аероліфтний фотобіореактор [15]

Аерліфтні фотобіореактори мають ті ж переваги, що й бульбашкові, але, на відміну від останніх, мають більшу ефективність перемішування за рахунок наявності тягової трубки (ліфту).

У пласкопаралельних фотобіореакторах культуральна суспензія розміщується всередині прозорої кювети, що освітлюється зовнішнім джерелом світла з одного чи двох боків; перемішується газом, який подається знизу. Але дана конструкція має ряд недоліків: при великій витраті газу він виходить практично без перемішування з культуральним середовищем, газообмін зростає до певної межі; щоб запобігти піноутворення – встановлюється механічний піногасник, в якому зосереджується значна кількість культури, яка не отримує світла; зовнішнє джерело світла нагромаджує конструкцію; такий тип фотобіореактору не підходить для всіх видів мікроводоростей.

Трубчасті фотобіореактори складається з двох модулів, з'єднаних між собою: світлового, який включає прозорі трубки, в якому переважно здійснюється фотосинтез, та газообмінного, що має вигляд резервуару. Перемішування здійснюється продуванням газу. Завдяки невеликому діаметру трубок, проблеми зі світлопостачанням немає. Газообмінний резервуар дає змогу мікроводоростям певний час перебувати в темряві, що є необхідним для проведення темнових метаболічних процесів. Недоліками фотобіореакторів даного типу є обростання стінок біореактору мікроводоростями через недостатню турбулентність перемішування, а також розділення процесу газообміну та фотосинтезу у просторі, внаслідок чого присутня просторова неоднорідність параметрів процесу культивування [15].

Висновки до розділу

Chlorella vulgaris - це добре вивчений одноклітинний еукаріотичний фототрофний організм, не вибагливий до умов навколишнього середовища і здатний досить інтенсивно розмножуватися, тому дуже широко поширений і зустрічається практично повсюдно. Хлорела широко використовується в різних галузях промисловості для різноманітних цілей, оскільки її обмін речовини досить лабільний та у своєму складі вона містить багато цінних речовин; причому, змінюючи умови культивування, можна направити метаболізм на синтез певних сполук.

Серед основних факторів, які впливають на ріст та життєдіяльність можна виділити температуру, рН та склад поживного середовища.

Сульфур є необхідним макроелементом, що необхідний для нормальної життєдіяльності, оскільки він входить до складу життєво важливих сполук, бере участь у різних реакціях метаболізму та необхідний для нормального поділу клітин. При нестачі Сульфуру знижується вміст хлорофілу, спостерігається хлороз, пригнічується фотосинтез, дихання та ділення клітин, але накопичується нейтральні ліпіди, оскільки клітини переходять у стресові умови. При підвищеній концентрації Сульфуру збільшується продуктивність клітин, зростає вміст білків та жирних кислот. Асимілюючою формою Сульфуру є його окиснені сполуки - сульфати, відновлені ж форми (сульфіди) чинять інгібуючу дію.

Оскільки *C. vulgaris* є мезофільним організмом, то оптимальною температурою для культивування є 26-30 °C. Але температура не однозначно діє на *C. vulgaris*: з одного боку збільшення температури інтенсифікує метаболізм, що призводить до зростання продуктивності мікроводоростей, з іншого боку - підвищення температури стає причиною посилення гідролізу сульфідів і як наслідок утворення сірководню, що є інгібітором. Оптимальне рН середовище для культивування хлорели є лужне, оскільки це зумовлює збільшення продуктивності біомаси, а також знижує інгібуючий вплив сульфідів.

Серед описаних фотобіореакторів для лабораторного культивування хлорели найкраще підходить аерліфтний тип, оскільки він має багато переваг (простота конструкції, низькі витрати на обслуговування та утримання, високі швидкості масо- та теплопередачі), а також він забезпечує найвищу інтенсивність перемішування та кращу розчинність сполук, що є необхідною умовою для живлення мікроводоростей.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМКІВ ТА МЕТОДИК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Одним з актуальних питань сьогодення є пошук способів очистки біогазу та газових викидів промислових підприємств. Одним з перспективних шляхів вирішення даної проблеми є використання біологічних способів очищення. Біофільтрація – це один з найбільш дешевих способів очистки повітря або біогазу від шкідливих та небажаних домішок. Сучасні досягнення мікробіології дозволяють культивувати нові штами, здатні використовувати в якості джерела енергії доволі токсичні речовини - такі, як SO_2 , SO_3 , H_2S . При використанні даного методу дані речовини слугують субстратом для мікроорганізмів, як правило аеробних, які перероблюють їх до кінцевих продуктів – води та вуглекислого газу, при цьому нарощується біомаса. На роль даних мікроорганізмів ідеально підходить *Chlorella vulgaris* – добре вивчена мікроводорість, що має пластичний метаболізм і здатна швидко пристосовуватися до умов свого існування [51].

Для всіх живих організмів характерні певні закономірності дії фактору зовнішнього середовища на організм. В свою чергу можна виділити зону оптимуму, в якій спостерігається найбільш сприятливі умови для життєдіяльності; зона норми, в якій всі життєво важливі процеси протікають нормально, однак для підтримки їх на цьому рівні необхідні додаткові енергетичні витрати; зона пригнічення, в якій знижується ефективність дії адаптивних механізмів і, як наслідок, порушується життєдіяльність організму. В свою чергу усі ці зони складають область витривалості, за межами якої життєдіяльність організмів стає неможливою [52].

Хоча Сульфур є макроелементом, який необхідний для життєдіяльності хлорели, відомо, що великі концентрації сполук Сульфуру пригнічують ріст мікроводорості. Тому необхідно дослідити область витривалості хлорели на дію

Сульфур, яка представлена в різних формах. Таким чином, одним з напрямів роботи є дослідження підвищеної концентрації сполук Сульфору на ріст мікроводорості *Chlorella vulgaris*.

Серед показників продуктивності автотрофних організмів, до яких відноситься хлорела, важливе місце належить пігментам, які забезпечують поглинання фотонів і визначають ефективність використання їх енергії. Наявні в науковій літературі дані свідчать про те, що між концентрацією пігментів і кількістю біомаси існує певна кореляційна залежність. Вони постійно синтезуються в рослинах, оновлюючи пігментний фонд, і забезпечує оптимальний функціонально-активний стан фотосинтетичного апарату.

Кількісне співвідношення різних груп пігментів в фотосинтетичному апараті мікроводоростей безпосередньо впливає на їх фотосинтетичну активність, а, отже, і на продуктивність фотосинтезу і подальше зростання біомаси. Каротиноїди є більш стабільним компонентом пігментної системи мікроводоростей, ніж хлорофіл *a*. Посилення в клітинах процесів каротиногенезу або руйнування хлорофілу свідчить про уповільнення рівня метаболізму і погіршенні фізіологічного стану водоростей. Цим пояснюється те, що при старінні популяцій фітопланктону і при несприятливих впливах на них факторів середовища, що сприяють деструкції хлорофілу *a*, величина (C_k / C_{chl}) зростає [53].

Отже, процеси утворення і руйнування пігментів пов'язані із метаболізмом мікроводоростей. Тому за вмістом пігментів оцінюють ступінь розвитку мікроводоростей, їх біомасу і первинну продукцію, судять про рівень трофії і навантаження біогенними елементами середовища існування. Тому напрямом дослідження також є визначення вмісту хлорофілів в біомасі *Chlorella vulgaris* при різних концентраціях сполук Сульфору.

2.1 Склад поживного середовища

У роботі в якості базового поживного середовища використовували середовище Б. В. Громова № 6, що є селективним середовищем [15].

Склад середовища (г/дм³): KNO₃ – 1.0; K₂HPO₄ – 0.2; MgSO₄·7H₂O – 0.2; CaCl₂ – 0.15; NaHCO₃ – 0.2; мікроелементи - 1 см³/дм³.

Розчин мікроелементів (г/дм³): ЕДТА – 10.0; ZnSO₄·7H₂O - 0.22; MnSO₄ – 1.81; CuSO₄·5H₂O – 0.079; NaBO₂·4H₂O – 2.63; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O – 1.0; FeSO₄·7H₂O – 9.3; Co(NO₃)₂·6H₂O – 0.02. Щоб запобігти формуванню осаду, компоненти вносили у наведеній послідовності. У першу чергу вносився трилон Б (ЕДТА), що утворює комплекси з іонами металів і запобігає утворенню нерозчинних солей [54]. Окремо готувався розчин мікроелементів, який додавався у кількості 1 см³/дм³.

Аналогом сірководню, що міститься в біогазі, слугував сульфід натрію у діапазоні концентрацій, що відповідає середньому вмісту сірководню в біогазі і знаходиться в межах (0.5, 1, 1.5, 2 об.%).

2.2 Лабораторна установка для нарощування біомаси

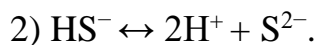
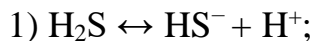
Культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* здійснювалося у фотобіореакторі, який відноситься до колонних реакторів з аероліфтом, і представляє собою циліндр із прозорого скла, місткістю 1.3 дм³, довжиною 250 мм, діаметром 40 мм. Робочий об'єм кожного реактора склав 1 дм³. Поживне середовище автоклаували протягом 1 год. при температурі 120 °С і тиску 250 кПа. Під час культивування *Chlorella vulgaris* синтезує антибіотик хлорелін, що перешкоджає контамінації середовища сторонньою мікрофлорою, тому підтримка асептики не була обов'язковою.

Як посівний матеріал було використано культуру мікроводоростей *Chlorella vulgaris* АСКУ 531-06, яка надана Інститутом ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ.

Визначення і контроль рН середовища здійснювали за допомогою рН-метру рН-150МИ (виробник - РФ) за методикою, що наведена в інструкції.

2.3 Методика внесення H_2S в культуральне середовище

Розчин H_2S у воді - слабка двохосновна сірководнева кислота, яка дисоціює у водному розчині у дві стадії:



На першій стадії утворюється гідросульфідний аніон, а на другій - сульфідний аніон. Відповідно сірководнева кислота утворює два види солей - середні (сульфіди) і кислі (гідросульфідні)

У присутності окисників або під впливом кисню повітря відбувається окиснення сульфід-іонів в сульфат-іон або вільну сірку [55].

Таким чином в якості моделюючої речовини сірководню можна використати розчинні сульфідні, в основному – це сульфідні лужних металів. В даному експерименті було використано сульфід натрію, який вносився в різних концентраціях (5 ммоль/дм³, 10 ммоль/дм³, 15 ммоль/дм³, 20 ммоль/дм³ сульфід-іонів), що відповідають середньому вмісту сірководню в біогазі, у вже заповнені поживним середовищем та культурою мікробіодоростей біореактори [36].

2.4 Визначення приросту біомаси, кількості та розмірів клітин

Кількість, життєздатність та розміри клітин визначалась за допомогою лічильника і аналізатора життєздатності клітин Countess II FL Automated Cell Counter (виробник - Китай) за методикою, що наведена в інструкції.

Зміну приросту біомаси визначали за значенням оптичної густини суспензії, яку вимірювали за допомогою спектрофотометра Ulab 102 (виробник - Китай) при довжині хвилі 450 нм, оскільки максимальний спектр поглинання світла

хлорофілом *a* знаходиться в межах 430 ÷ 450 нм [56]. Для дослідження використовували скляні кювети з довжиною оптичного шляху $l = 1$ см.

Суху масу мікроводоростей визначали за допомогою ваг ВЛА–200г–М (виробник - Україна). Біомасу мікроводоростей виділяли з культурального середовища, використовуючи прибор вакуумного фільтрування ПВФ-35/2 Б (виробник - РФ) та вакуумний насос 2XZ-0.5 ULAB (виробник - Китай). Фільтрували суспензію мікроводоростей, використовуючи фільтрувальний папір (синя стрічка ТУ 6-09-1678-95, Україна) .

Біомасу висушували в сушильній шафі 2В-151 (виробник - РФ) при 110°C до досягнення постійної ваги. Концентрацію біомаси визначали за формулою:

$$C_B = \frac{(m_k - m_n) \cdot 1000}{V}, \text{ г/дм}^3 \quad (2.1)$$

де m_k - маса фільтру з біомасою після висушування, г; m_n - маса фільтру, г; 1000 - перерахунок на об'єм 1 дм³, V - аліквота, з якої одержували суху біомасу, дм³.

2.5 Визначення вмісту хлорофілів *a* та *b*

Екстракцію хлорофілу з клітин мікроводоростей здійснювали за методикою Dere [57]. З огляду на гідрофобні властивості пігментів для екстракції використовували 96% етанол. Наважку масою 1 г гомогенізували у ступці перемішуючи з 50 см³ 96% етанолу. Одержану суміш центрифугували на центрифугі 80-2А (виробник – Китай) при 1000 об/хв. протягом 1 хв. Одержаний гомогенат фільтрували через 2 шари марлевої тканини, фільтрат центрифугували при 2500 об/хв. протягом 10 хв. Оптичну густину одержаного супернатанту визначали за допомогою спектрофотометра Ulab 102 при довжинах хвиль 662 нм та 646 нм, що відповідають максимуму поглинання для хлорофілу *a*, хлорофілу *b* відповідно. Вміст хлорофілу *a*, хлорофілу *b* розраховували за формулами:

$$C_a = 15.65 \cdot A_{666} - 7.340 \cdot A_{653}, \quad (2.2)$$

$$C_b = 27.05 \cdot A_{653} - 11.21 \cdot A_{666}, \quad (2.3)$$

де, C_a - вміст хлорофілу a (мг/см³); C_b - вміст хлорофілу b (мг/см³); A_{666} - поглинання світла при 666 нм; A_{653} - поглинання світла при 653 нм.

2.6 Визначення вмісту ліпідів у біомасі мікробіодоростей

Вміст ліпідів у біомасі мікробіодоростей визначався за методом Сокслета [54, 58]. Наважку сухої біомаси мікробіодоростей перемішували з піском у співвідношенні 1:2.5, відповідно. Отриману суміш кількісно переносили в паперову гільзу, довжина якої має бути нижчою за верхнє коліно h-подібної сифонної трубки. В якості екстрагенту використовували гексан, який наливали у попередньо зважену приймальну колбу. Упродовж часу, за який спостерігалось повне знебарвлення розчину (6 год. при 6 – 10 зливах за годину), проводилось екстрагування. По завершенню екстракції з приймальної колби відганяли гексан для повторного використання. Ліпіди, що залишилися в приймальній колбі, висушували в сушильній шафі 2В-151 (виробник - РФ) до постійної маси при 105 °С. Вміст ліпідної фракції у біомасі мікробіодоростей визначали за формулою:

$$x = \frac{a - b}{g} \cdot 100\%, \quad (2.4)$$

де x - вміст ліпідної фракції, %, a - маса колби з ліпідною фракцією, г, b - маса порожньої колби, г, g - маса наважки мікробіодоростей, г.

2.7 Визначення сульфід та сульфат іонів

Культуральне середовище центрифунували на центрифугі 80-2А (виробник – Китай) при 1000 об/хв. протягом 15 хв для відділення крупних часток та клітин. Отриманий фугат фільтрували, використовуючи фільтрувальний папір (синя стрічка ТУ 6-09-1678-95, Україна). В отриманому фільтраті проводили якісні реакції на сульфід іон та сульфат іон, додаючи розчин $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ та $\text{Ba}(\text{OH})_2$ відповідно. Катіони Cu^{2+} зв'язують сульфід іони з утворенням чорного осаду, а

катионів Ba^{2+} зв'язують сульфат іони з утворенням білого осаду. Для визначення кількості іонів у зразках їх фільтрували, використовуючи фільтрувальний папір (синя стрічка ТУ 6-09-1678-95, Україна). Осад висушували в сушильній шафі 2В-151 (виробник - РФ) при $110^{\circ}C$ до досягнення постійної ваги.

2.8 Математична обробка одержаних даних і оцінка похибок

Усі експерименти були здійснені у трьох повторностях. Використовуючи стандартні методи обробки експериментальних даних, було опрацьовано результати дослідження. Щоб оцінки вимірювані величини, які містять випадкові похибки використовували метод найменших квадратів. У програмі MSExcel було проведено графічну інтерполяцію. Отримані дані були використані для розрахунку наступних показників:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (2.5)$$

де, n - число спостережень, \bar{x} - середнє арифметичне величини.

$$\sigma = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}, \quad (2.6)$$

де, σ - середнє квадратичне відхилення (стандартне відхилення) окремого визначення у вибірці.

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \quad (2.7)$$

де, m - стандартна помилка середнього відхилення

Діапазон значень m , показує діапазон в якому повинно знаходитися середнє значення будь-якої випадкової величини. Результати експерименту вважалися достовірними за умови, що стандартна помилка середнього відхилення не перевищувала 5%.

Висновки до розділу

Методики, що використовуються у роботі дозволяють: дослідити вплив сульфідів на клітини *Chlorella vulgaris*, визначати приріст біомаси, вміст ліпідної фракції, вміст хлорофілів *a* та *b*, присутність сульфід та сульфат іонів, спостерігати за розвитком клітин тощо.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Для адаптації та визначення динаміки росту *Chlorella vulgaris* за різної концентрації сульфідів, мікроводорості культивувались протягом 33 днів. В експерименті було 5 зразків:

- контроль – поживне середовище та культура мікроводоростей без додавання сульфиду натрію;
- 1 - поживне середовище та культура мікроводоростей з додаванням Na_2S у концентрації 5 ммоль/дм³, що відповідає 0.5 об.% сірководню в біогазі;
- 2 - поживне середовище та культура мікроводоростей з додаванням Na_2S у концентрації 10 ммоль/дм³, що відповідає 1 об.% сірководню в біогазі;
- 3 - поживне середовище та культура мікроводоростей з додаванням Na_2S у концентрації 15 ммоль/дм³, що відповідає 1.5 об.% сірководню в біогазі;
- 4 - поживне середовище та культура мікроводоростей з додаванням Na_2S у концентрації 20 ммоль/дм³, що відповідає 2 об.% сірководню в біогазі.

Сульфід натрію вносили на початку культивування. рН підтримували в межах раціональних значень для культивування *Chlorella vulgaris*. Результати дослідження впливу Na_2S на ріст *Chlorella vulgaris* при однакової вихідної концентрації клітин мікроводорості представлені на рис. 3.1-3.4. Культивування проводили при температурі 18 ± 2 °C.

Як видно з графіку (рис. 3.1), в перші 10 діб культивування найбільший приріст спостерігався для культури, що вирощували за контрольних умов. Починаючи з 8 доби починається експоненційна фаза росту культури, що вирощували при підвищеній концентрації сульфід-іонів. На 8 добу культура, вирощена у контрольному зразку переходить у стаціонарну фазу росту. Експоненціальний приріст біомаси мікроводоростей при підвищеній концентрації сульфід-іонів спостерігається до 14 доби, а починаючи з 22 доби приріст оптичної густини складає 0,266 од/см³. Найменший приріст спостерігається для контролю і зразку 1, тобто за нижчої концентрації сульфід-іону. Зразки 2 та 3 мають приблизно однаковий приріст.

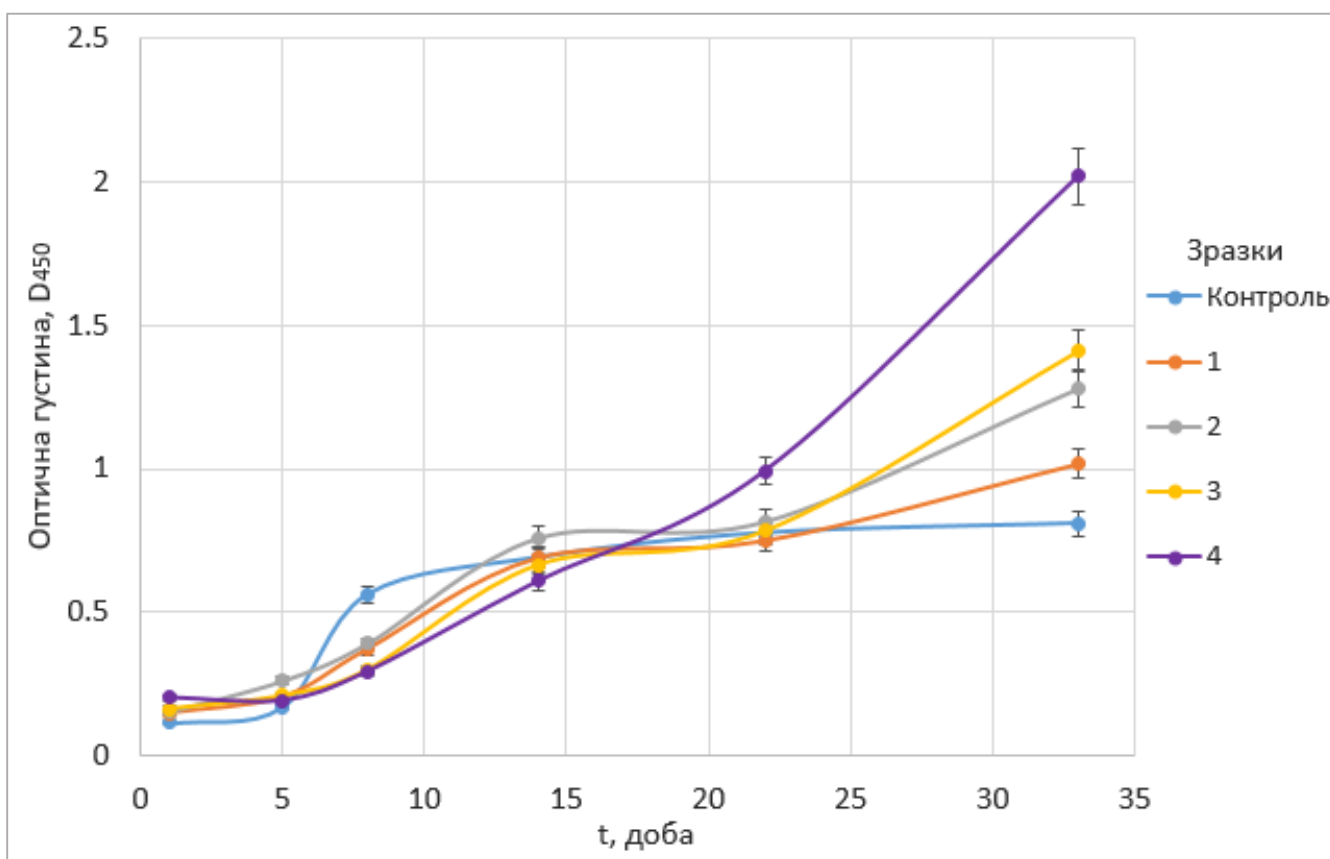


Рисунок 3.1 – Графік залежності оптичної густини D_{450} біомаси *Chlorella vulgaris* в процесі культивування (t) при різному вмісті сульфіді натрію в середовищі

На рис. 3.2 зображено відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* протягом 33 днів культивування. З графіку видно, що на початку експерименту найбільший приріст спостерігався для контролю, всі інші зразки були майже на одному рівні. Але, починаючи з 8 дня, крива контролю виходить на плато, а крива зразку 1 виходить на плато на 12 день. Динаміка приросту клітин для зразку 2 майже не змінюється після адаптації (8 день) до кінця експерименту, на графіку це зображується прямою лінію – а вже на 33 день приріст є більшим за приріст зразка 1 та контролю. Після адаптації приріст зразків 3 та 4 починає стрімко зростати і так триває до кінця експерименту.

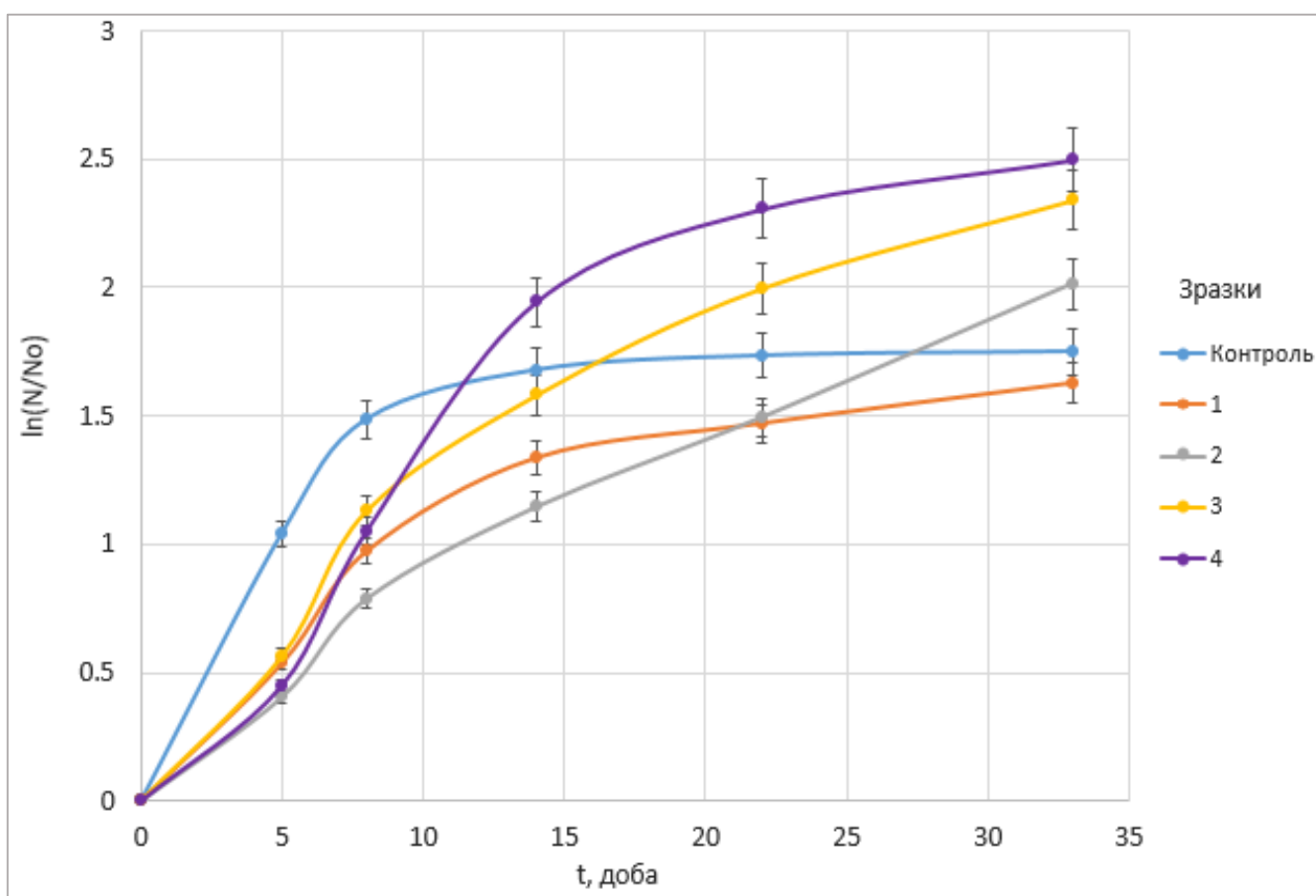


Рисунок 3.2 - Відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* протягом 33 діб культивування при різному вмісті сульфиду натрію в середовищі

Рис. 3.3 ілюструє приріст біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris*. Найбільший приріст сухої біомаси спостерігався для зразку 2, далі для зразку 1, зразку 4, далі для контролю та зразку 3, які майже на одному рівні. Відмінні результати оптичної густини та відносного приросту клітин у порівнянні з виходом сухої біомаси біомаси мікроводоростей пояснюється тим, що в зразках з високим вмістом сульфідів натрію (3 та 4) кількість клітин була значно більшою за кількість клітин в інших зразках (контроль, 1 та 2). Проте середній розмір клітин зменшувався при підвищенні вмісту сульфідів натрію в культуральному середовищі у ряду: контроль, зразок 1, зразок 2, зразок 3, зразок 4 (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Середній розмір клітин *Chlorella vulgaris* в різних зразках

Зразок	Контроль	1	2	3	4
Розмір, мкм	8±0.4	6±0.3	6±0.3	5.5±0.28	4±0.28

Тому за рахунок незначного розміру клітин та їх великої кількості у зразку 4 на одиницю об'єму відбувається краще розсіювання світла і підвищення значення оптичної густини.

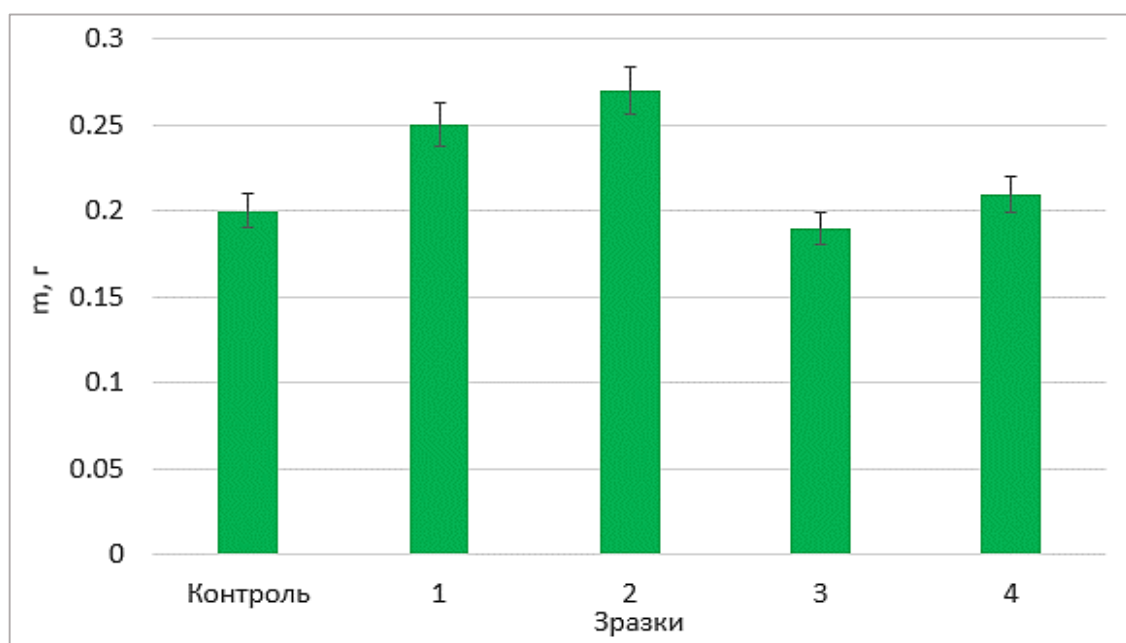


Рисунок 3.3 – Вихід сухої біомаси *Chlorella vulgaris* (m) за 33 доби культивування за різного вмісту сульфідів натрію в середовищі

Таким чином, найбільший приріст біомаси характерний для культури, що вирощували на середовищі з концентрацією сульфід-іону 10 ммоль/дм^3 , що на 35% вище, ніж за контрольних умов. Більші концентрації сульфиду натрію в середовищі призводять до зменшення приросту біомаси.

На рис. 3.4 зображено вміст хлорофілів в сухій біомасі *Chlorella vulgaris*. Вміст як хлорофілу *a*, так і хлорофілу *b* зменшується при збільшенні вмісту сульфід-іону в середовищі в ряду: контроль, зразок 1, зразок 2, зразок 3, зразок 4.

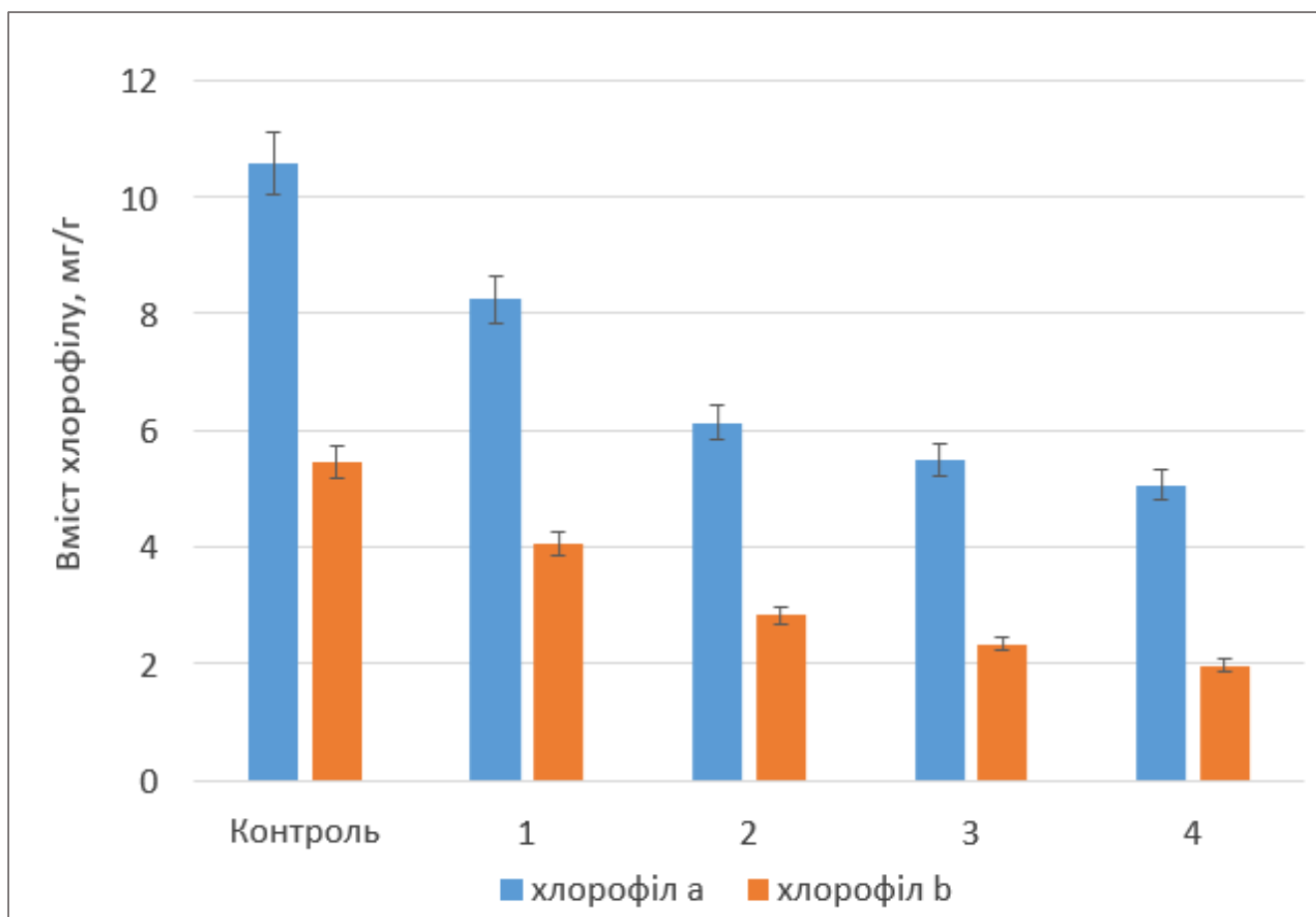


Рисунок 3.4 - Вміст хлорофілів *a* та *b* у сухій біомасі *Chlorella vulgaris*

Вміст ліпідів, що визначали за методом Сокслета, показав їх наявність тільки у контрольному зразку. Це свідчить про відсутність неполярних триацилгліцеролів у зразках, які культивувалися за підвищеного вмісту сульфиду натрію.

Відповідно до одержаних даних можна зробити наступні висновки. На початку дослідження клітини *Chlorella vulgaris* не адаптовані і сульфід-іон діє як інгібітор росту – найкраще ростуть мікроводорості у контролі, інші зразки ростуть набагато гірше, причому їх приріст клітин знаходиться приблизно на однаковому рівні. Інгібуючу дію сульфідів можна пояснити утворенням нерозчинних сполук сульфідів металів (Fe, Mn, Zn), що входять до складу ферментів, коферментів, вітамінів та інших важливих сполук, які беруть участь у метаболізмі клітини.

Після адаптації культури спостерігаємо дещо іншу картину. Сульфіді вже не чинять такого інгібуючого ефекту, як на початку експерименту: зразки з найвищою концентрацією ростуть нормально, проте такі умови не є оптимальними - найкраще культура росте у зразку 2, де концентрація за сульфуром складає 10 ммоль/дм³. Контроль, навпаки, знижує швидкість росту - приріст клітин виходить на плато, оскільки у культуральному середовищі вичерпується сульфур, який наявний в поживному середовищі – і ріст знижується за нестачі даного макроелемента. У зразках з додатковим внесенням сірки у формі сульфідів, навпаки, зменшується вміст інгібуючої речовини – сульфідів, оскільки вони окиснюються до сульфітів та сульфатів, які є основною асимілюючою формою для мікроводорості *Chlorella vulgaris*. Чим менша концентрація сульфідів у культуральному середовищі – тим швидше більша їх частина перейде у сульфіти та сульфати. Тому приріст клітин зразка 1 після адаптації швидко досягає плато, в той час, як зразки 2, 3 та 4 продовжують активно ділитись, причому до кінця експерименту найбільший відносний приріст клітин спостерігається для зразка 4, оскільки в культуральному середовищі найбільша концентрація асимілюючої форми сірки - сульфітів та сульфатів, а Сульфур є важливим та необхідним елементом для нормального поділу клітин. Проте, найбільший приріст сухої біомаси мікроводоростей спостерігався для зразка 2, концентрація сірки в якому, ймовірно, є раціональною для вирощування *Chlorella vulgaris* і не чинить негативного впливу на розвиток культури.

Розмір клітин та вміст хлорофілу зменшується зі збільшенням концентрації сульфідів у вихідних зразках, це може бути причиною того, що у зразках 3 та 4 клітини активно діляться, тому в популяції переважають молоді клітини, які мають менші розміри та вміст хлорофілу, ніж зрілі. Найповільніше ділились клітини у другій половині експерименту у зразку 1 та контролі, відповідно, їх клітини досягали максимального розміру та накопичували більше хлорофілу у клітинах у порівнянні з іншими зразками.

Результати досліду з вмістом ліпідів у клітинах підтверджуються даними, одержаними іншими авторами: вміст ліпідів збільшується в клітинах за нестачі сульфуру в середовищі, оскільки нестача Сульфуру є стресовим фактором, а в таких умовах клітини починають накопичувати запасні речовини [50]. При цьому можливо згідно роботи [49], що за надлишку сульфуру синтезуються поліненасичені жирні кислоти та полярні ліпіди, які входять до складу мембран і не визначаються методом, що використовувався у даному експерименті.

Для підтвердження припущення, що сульфід-іон протягом певного часу окиснюється до сполук, які в межах досліджуваних концентрацій не мають токсичного впливу на мікроводорості – тобто до сульфітів та сульфатів, а також, щоб виявити раціональне співвідношення кількості клітин до концентрації сульфід іонів, досліджували ріст адаптованих клітин при постійному співвідношенні (кількість клітин)/(концентрація сульфиду натрію). Культивування проводили протягом 11 діб. Температура культивування складала $21 \pm 2^\circ\text{C}$.

Початкову концентрацію клітин змінювали пропорційно концентрації сульфиду:

- для контролю – найменша
- для зразку 4 – найбільша.

Результати дослідження представлено на рис. 3.5.

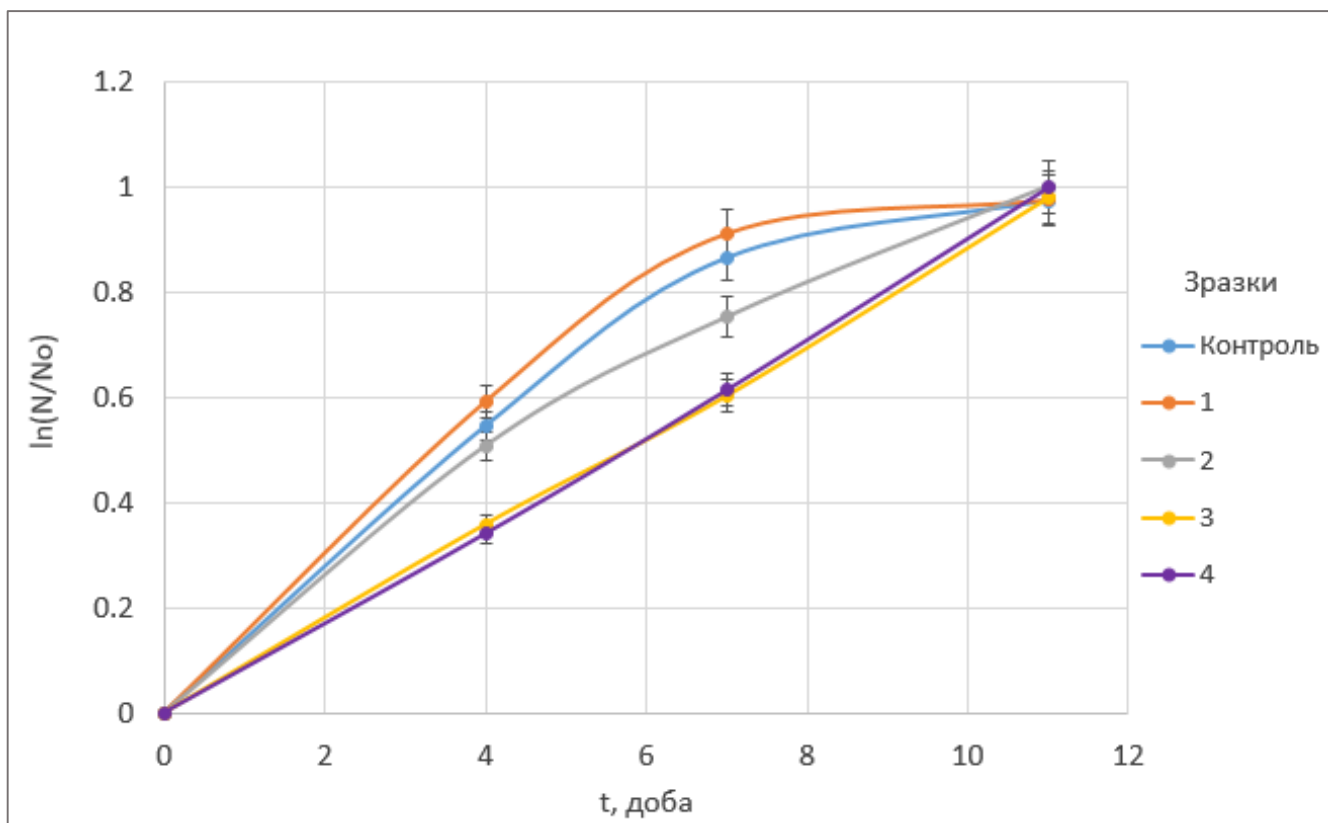


Рисунок 3.5 – Відносний приріст клітин *Chlorella vulgaris* протягом 11 днів культивування при однаковому співвідношенні (концентрація клітин)/(концентрація сульфідів натрію)

З графіку видно, що для усіх зразків клітини мікроводоростей вже не проходять фазу адаптації, оскільки криві мають вигляд прямих, але кут нахилу різний: приріст клітин для зразків 1 та контроль є найбільшим, а для зразків 3 та 4 – найменшим, проте наприкінці експерименту перші зразки знову виходять на плато, що може свідчити про вичерпання у культуральному середовищі джерел сірки. Проте інші зразки не проявляють спаду швидкості приросту клітин, і вже на 11 день прирости клітин для зразків 2, 3 та 4 перевищують приріст клітин зразків 1 та контролю. Причому даний день (11) приблизно співпадає з днем (12) першого

експерименту, після якого приріст клітин для зразків 4 та 3 починає перевищувати приріст клітин для контролю.

Рис. 3.6 демонструє вихід сухої біомаси клітин мікроводоростей на 11 день культивування. Відповідно до рис. 3.6 найбільший приріст біомаси спостерігали для зразку 2, далі для зразку 1, зразку 4, для контролю та зразку 3.

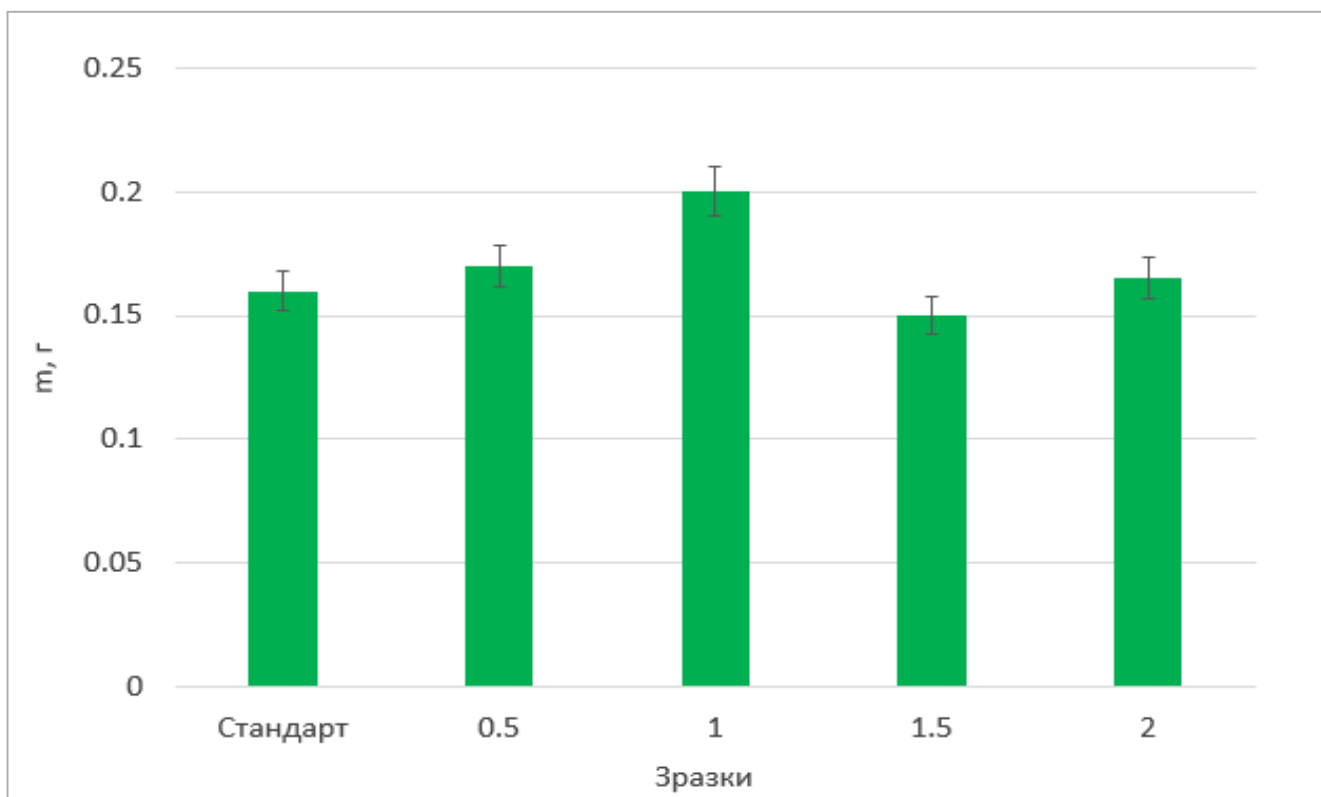


Рис. 3.6 – Вихід сухої біомаси *Chlorella vulgaris* через 11 діб культивування в залежності від концентрації сульфиду натрію при однаковому співвідношенні (концентрація клітин)/(концентрація сульфиду натрію)

Помірний приріст клітин протягом всього експерименту, та середній розмір клітин зумовив те, що зразок 2 накопичив найбільшу кількість сухої біомаси. Серед інших зразків накопичена суха маса відповідає приблизно одному рівню; контроль та зразок 1 показали такий результат за рахунок найбільшого розміру клітин та найбільшого приросту клітин на початку експерименту, в свою чергу зразки 3 та 4, за рахунок найбільшого темпу приросту клітин в кінці експерименту.

Таким чином, сульфіді в таких концентраціях також проявляють інгібуючу дію, проте після переходу їх в окиснену форму, навпаки, швидкість приросту клітин зростає. Як і в попередньому досліді оптимальна концентрація сірки виявилась у зразку 2. Тобто, концентрація сульфідів в межах, що відповідають концентрації сірководню в біогазі 1%, не чинить інгібуючої дії, що призводить до зниження темпів приросту клітин хлорели не залежно від їх концентрації.

Для з'ясування швидкості переходу сульфід-іону в сульфід- та сульфат-іони та швидкості споживання сульфур у залежності від початкової концентрації сульфідів натрію було проведено якісні реакції на сульфід-аніон та сульфат-аніон у фугаті культурального середовища зразків протягом другого досліді. Через 4, 8 та 24 год після внесення сульфідів натрію до культурального середовища було виявлено у всіх зразків (0.5; 1; 1.5; 2) сульфід-аніон та сульфат-аніон, причому їх кількість збільшувалась у ряду: зразок 0.5, зразок 1, зразок 1.5, зразок 2. Через 3, 5, 8 діб після внесення сульфідів натрію у зразках поступово зменшувалась концентрація сульфід-іону та збільшувалась концентрація сульфат-іонів, а по закінченню експерименту (на 11 добу) у зразку 2 - з максимальною кількістю сульфід іонів - їх виявлено не було.

Отже, дані результати підтверджують перший дослід: спочатку сульфід присутній у середовищі і чинить інгібуючу дію, однак після 10-12 діб в залежності від концентрації сульфід повністю окиснюється у сульфат, який є поживною сполукою для культури. Дані результати також підтверджують результати інших досліджень [36, 38, 41].

Висновки до розділу

У даному розділі було виявлено вплив сполук сірки на ріст клітин *Chlorella vulgaris*, а також на біосинтез хлорофілів та ліпідів. Встановлено, що сульфіді інгібують ріст *Chlorella vulgaris* незалежно від вихідної концентрації клітин. З часом сульфіді окиснюються до сульфатів, які в свою чергу стимулюють розмноження клітин, оскільки вони є основною асимілюючою формою сірки. Розмір клітин та вміст хлорофілів зменшується зі зростанням концентрації сульфатів у культуральному середовищі. Зменшення концентрації сульфатів призводить до збільшення вмісту в клітинах ліпідів, до складу яких входять насичені жирні кислоти.

Виявлено, що оптимальною концентрацією сульфідів для культивування *Chlorella vulgaris* з метою очищення біогазу від сірководню є концентрація, що відповідає 1% об'ємних одиниць сірководню в біогазі. Отже, застосування *Chlorella vulgaris* для очищення біогазу від сірководню можливе при попередньому розбавленні біогазу з метою корегування концентрації сірководню.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

Під час виконання робіт в лабораторії необхідно дотримуватися Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях, що були затверджені Указом Президента України від 6 квітня 2011 року Закону України «Про охорону праці» № 402.

Вимоги до приміщень та обладнання хімічних лабораторій [59]:

- в кожній хімічній лабораторії забезпечуються організаційні заходи щодо пожежної безпеки відповідно до вимог Правил пожежної безпеки в Україні;
- для всіх приміщень та зон має бути визначено категорію щодо вибухопожежної та пожежної небезпеки відповідно до вимог Норм визначення категорій приміщень, будинків та зовнішніх установок за вибухопожежною та пожежною небезпекою;
- у приміщенні хімічних лабораторій повинні знаходитися первинні засоби пожежогасіння (ящики з сухим піском, вогнегасники, пожежні покривала з негорючого теплоізоляційного матеріалу тощо);
- приміщення хімічних лабораторій обладнуються загальнообмінною примусовою вентиляцією;
- у кожному робочому приміщенні хімічної лабораторії на видному та легкодоступному місці повинна знаходитися аптечка з набором необхідних медикаментів для надання першої (долікарняної) допомоги.

Вимоги безпеки до працівників хімічних лабораторій та їх робочих місць [59]:

- працівники хімічних лабораторій повинні забезпечуватися спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими ЗІЗ відповідно до вимог

Положення про порядок забезпечення працівників спеціальним одягом, спеціальним взуттям та іншими засобами індивідуального захисту;

- всі роботи з хімічними речовинами слід проводити тільки у витяжних шафах. Витяжні шафи повинні бути обладнані відсмоктувачами;
- припливно-витяжна вентиляція в усіх приміщеннях вмикається за 30 хвилин до початку проведення робіт і вимикається після закінчення проведення робіт;
- зливати кислоти і луги необхідно у спеціальну тару із подальшою нейтралізацією. Невеликі кількості кислот і лугів у вигляді розведених розчинів можна виливати у раковину із наступним промиванням 10-кратним об'ємом води;
- при змішуванні або розведенні речовин, що супроводжується виділенням тепла, слід користуватися термостійким скляним або фарфоровим посудом;
- забороняється залишати без нагляду робоче місце, ввімкнені нагрівальні прилади і працююче лабораторне обладнання, перелік якого визначений інструкцією з охорони праці, виробничої санітарії і пожежної безпеки.
- При задимленні, загорянні або інших ознаках пожежі (горіння) необхідно:
 - негайно викликати пожежну охорону;
 - вжити (за можливості) заходів щодо евакуації людей, гасіння (локалізації) пожежі та збереження матеріальних цінностей;
 - довести до відома керівника лабораторії або відповідної посадової особи та (або) чергового.
- кожен працівник хімічної лабораторії повинен знати місце розташування первинних засобів пожежогасіння та вміти користуватися ними, бути ознайомленим з основними вимогами виробничої та особистої гігієни, правилами надання першої медичної допомоги;

- для нейтралізації пролитих кислот або лугів в хімічній лабораторії мають бути склянки із заздалегідь приготовленими нейтралізуючими розчинами (харчової соди - для кислот та оцтової кислоти - для лугів тощо). Тверді відходи, які накопичуються в хімічній лабораторії, необхідно збирати в окрему тару і знищувати у місцях, узгоджених з органами санітарного і пожежного нагляду;
- після закінчення роботи необхідно вимкнути світло, воду, газ, електроприлади, що застосовувалися при виконанні такої операції, привести в порядок своє робоче місце.

При експлуатації центрифуги забороняється [60]:

- включати центрифугу без ротора, працювати без кришки і з відкритою кришкою центрифуги, ротор і кришка повинні бути ретельно закріплені;
- відкривати кришку ротора до повної зупинки центрифуги;
- несиметрично завантажувати ротор
- застосовувати саморобні плавкі вставки, пристосування, нестандартні пробірки.

При експлуатації сушильної шафи [60]:

- не доторкатися до корпусу при установці високих температур, щоб уникнути опіку,
- чищення робити тільки при відключенні від мережі.

При експлуатації електроприладів необхідно дотримуватися наступних вимог [60]:

- дотримуйте інструкції по експлуатації заводу-виготовлювача;
- забороняється залишати включене електроустаткування без догляду;
- не ставити на електроустаткування ємність з рідиною чи препаратами;
- по закінченні роботи з необхідно відключити його від мережі.

Висновки до розділу

Для уникнення травм та нещасних випадків при роботі в лабораторії, а також для забезпечення безпеки на робочому місці - необхідно знати та дотримуватися Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях.

ВИСНОВКИ

1. На основі аналізу літературних джерел встановлено, що для розвитку клітин *C. vulgaris* Сульфур є необхідним макроелементом. При нестачі Сульфору знижується вміст хлорофілу, пригнічується фотосинтез, дихання та поділ клітин, але накопичуються нейтральні ліпіди. При підвищеній концентрації Сульфору збільшується продуктивність клітин, зростає вміст білків та жирних кислот. Асимілюючою формою Сульфору є сульфат-іон, сульфід-іон чинить інгібуючу дію.

2. Сульфід-іони не залежно від концентрації збільшують тривалість лаг-фази росту *Chlorella vulgaris*. Найбільший приріст біомаси характерний для культури, яку вирощували на середовищі з концентрацією сульфід-іонів 10 ммоль/дм^3 , що на 35% вище, ніж за контрольних умов. При збільшенні концентрації сульфід-іонів приріст біомаси зменшується, що пов'язано з інгібуючим впливом іонів на розвиток клітин. Визначено, що раціональною початковою концентрацією сульфід-іонів є концентрація, що відповідає 1% об'ємних одиниць H_2S в біогазі.

3. Встановлено, що в процесі культивування сульфід-іон окиснюється до сульфату, що має стимулюючий вплив на розвиток та розмноження клітин. Розмір клітин зменшується при підвищенні початкової концентрації сульфід-іонів, а їх кількість збільшується. При постійному співвідношенні початкової концентрації клітин до сульфід-іонів найбільший приріст біомаси характерний для початкової концентрації сульфід-іонів 10 ммоль/дм^3 .

4. Вміст хлорофілів *a* та *b* в біомасі зменшується зі зростанням концентрації сульфід-іонів у культуральному середовищі. Найменший вміст хлорофілів характерний для культури, що вирощували у середовищі з концентрацією сульфід-іонів 20 ммоль/дм^3 , що вдвічі нижче, ніж за контрольних умов.

Отже, одержані результати є підґрунтям для створення технології з утилізації забруднюючих сірковмісних сполук у біогазі та газових викидів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Дячок В.В., Левко О.Б. Вивчення процесу масообміну при перетворенні вуглекислого газу у метан біологічним методом. *Екологічна безпека*. 2014. №1(17). С.31-35.
2. Olumide Wesley Awe, Yaqian Zhao, Ange Nzihou, Doan Pham Minh, Nathalie Lyczko. A Review of Biogas Utilisation, Purification and Upgrading Technologies. *Waste Biomass Valor.* 2017. p.1-18.
3. Мамедова Ф.Т. Различные подходы к накоплению биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* и к процессам ее биокаталитической трансформации : дис. ... канд. хим. наук : 03.01.06. Москва, 2015. С.176.
4. Roudsari F.P., Mehrnia M.R., Asadi A., Moayedi Z., Ranjbar R. Effect of microalgae activated sludge ratio on cooperative treatment of anaerobic effluent of municipal wastewater. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014. V.172. p.131 – 14.
5. Моисеев И., Тарасов В., Трусков Л. Эволюция биоэнергетики. Время водорослей. *The Chemical Journal.* 2009. № 12. С. 24–29.
6. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Microbiol. Biotechnol.* 2004. V. 65. p. 635–648.
7. Аужанова Н.Б. Морфологическая и систематическая характеристика хлореллы. Ее производство и применение. *Научный вестник*. 2014. №1. С.113-126.
8. Дворецкий Д. С., Дворецкий С. И., Темнов М. С. Технология получения липидов из микроводорослей : монография. Тамбов : ФГБОУ ВПО «ТГТУ», 2015. 100 с.
9. Богданов Н.И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. : монография. Пенза : ВНИИОЗ, 2007. 48 с.
10. Carl Safi, Bachar Zebib, Othmane Merah, Pierre-Yves Pontalier, Carlos Vaca-Garcia. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*. *Renewable and Sustainable Energy.* 2014. № 35. С. 265–278.

11. Рубин А.Б. Биофизика фотосинтеза и методы экологического мониторинга. *Технология живых систем*. 2005. Т. 2. С. 47-68.
12. ООО "Европолитест": тест-объекты - Хлорелла (*Chlorella vulgaris*).
URL: http://europolytest.com/information/testobjekts/testobjekts-1_18.html (дата
звернення: 19.04.2019)
13. Чернова, Н. И. Эффективность производства биодизеля из микроводорослей. *Энергосбережение, новые и возобновляемые источники энергии*. 2014. С. 14 – 21.
14. Швец, В. И. Фосфолипиды в биотехнологиях. *Вестник МИТХТ*. 2009. С. 4 – 25.
15. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікрроводоростей у біотехнології : монографія. К. : Альтерпрес, 2008. 235 с.
16. Макарова Е. И., Отурина И. П., Сидякин А. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. *Экосистемы, их оптимизация и охрана*. 2009. Вып. 20. С. 120–133.
17. Gigova L., Marinova G. Significance of microalgae - grounds and areas. *Genetics & Plant Physiology*. 2016. Vol. 6(1–2). С.26-31.
18. Jerry D Murphy, Bernhard Drosch, Eoin Allen. A perspective on algal biogas. *IEA Bioenergy*. 2015. 40 с.
19. Минюк Г. С. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс. *Морской экологический журнал*. 2008. –Т. 7, № 2. С. 5–23.
20. Spolaore, P. Commercial applications of microalgae. *Biosci. Bio eng.* 2006. V. 101, N. 2. P. 87—96.
21. Ефремова Н. Е. Разработка способов получения антиоксидантных препаратов на основе биоактивных веществ цианобактерий и микроводорослей : автореферат : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20. Кишинев, 2009. 29 с.

22. Янкевич М. И. Формирование ремедиационных биоценозов для снижения антропогенной нагрузки на водные и почвенные экосистемы: автореферат : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.20. Щелково, 2002. – 50 с.
23. Моисеев И., Тарасов В., Трусов Л. Эволюция в биоэнергетике. Время водоросле. *Альтернативная энергетика*. 2009. № 12. С. 24–29.
24. Mann G., Schlegel M., Schumann R., Sakalauskas A. Biogas-conditioning with microalgae. *Agronomy Research*. 2009. 7(1). С. 33-38.
25. Bailón Allegue, L., Hinge, J. Biogas upgrading Evaluation of methods for H₂S removal. *Danish Technological Centre*. Copenhagen, 2014. С.1-31.
26. Takashi Furihata, Supreeya Pomprasirt. Characteristics of Sulfite Transport by *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Physiol*. 1997. 38(4). P.398-403.
27. Latala A. Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. *OCEANOLOGIA*. 1991. № 31. С.119-138.
28. SolverBook: свойства и все характеристики сероводорода. URL: <http://ru.solverbook.com/spravochnik/ximiya/soedineniya/serovodorod/> (дата звернения: 24.04.2019)
29. Alondra A. Cortés, Sebastián Sánchez-Fortún. Effects of pH on the growth rate exhibited of the wild-type and Cd-resistant *Dictyosphaerium chlorelloides* strains. *Limnetica*. 2018. № 37(2). С. 229-238.
30. Daliry S., Hallajisani A., Mohammadi Roshandeh J. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage*. 2017. №3(2). С. 217-230.
31. Mostafa M. El-Sheekh. The effect of different growth conditions on the biomass and chemical constituents of *Chlorella vulgaris*. *Egypt. J. Exp. Biol*. 2018. № 14(1). С. 121 – 131.
32. David J. Spedding, Irmrgarg Ziegler. Effect of pH on the Uptake of ³⁵S-sulfur from Sulfate, Sulfite, and Sulfide by *Chlorella vulgaris*. *Pflanzenphysiol*. 1980. Bd. 97. P. 205-214.

33. Jamal E., Luturmas A. Some eco-physiological responses of *Chlorella vulgaris* culture in different environmental conditions. *AACL Bioflux*. Volume 9, Issue 5. C. 1030-1035
34. Паршикова Т.В., Третьяков В.О., Пацко О.В. Застосування мікроелементів для оптимізації мінерального живлення за промислового культивування мікроскопічних водоростей. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2010. Т.42 №5. С. 403-413.
35. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей: монография. Рига: Зинатне, 1983. 240 с.
36. González-Sánchez A., Posten C. Fate of H₂S during the cultivation of *Chlorella* sp. deployed for biogas upgrading. *Journal of Environmental Management*. 2017. №191. P.252-257.
37. Krausst F., Schmid A. Sulphur Sources for Growth of *Chlorella fusca* and Their Influence on Key Enzymes of Sulphur Metabolism. *Journal of General Microbiology*. 1987. № 133. C.1209-1219.
38. Giordano M., Norici A., Hell R. Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New phytologist*. №166 C.371–382.
39. Dorman DC, Moulin FJM, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. Cytochrome oxidase inhibition by acute hydrogen sulfide inhalation: Correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci*. 2002. V. 65. P.18–25.
40. Kuster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna*. *Environ. Toxicol. Chem*. 2005. 24(10). 2621–2629.
41. Golub N.B., Voyevoda D.V. Effect of Sulphur compounds on cultivation process of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Вісник Національного університету "Львівська політехніка". Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2013. № 761. С.151-158.

42. Голуб Н.Б., Бунча В.Ю. Вплив іонів лужних металів на приріст біомаси та накопичення ліпідів (метаболізм) у *Chlorella vulgaris*. *Наукові вісті НТУУ "КПІ"*. 2012. №3. С. 12–17.
43. Золоторева Е.К., Шнюкова Е.И., Подорванов В.В. Микроводоросли как продуценты водорода. *Альгология*. 2010. Т. 20. №2. С. 224-249.
44. Антал Т. К. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата к недостатку основных элементов минерального питания : дис. ... д-ра биол. наук : 03.01.02. Москва, 2018. – 252 с.
45. Adoracion P. Resurreccion , Amane Makino. Effects of sulfur nutrition on the growth and photosynthesis of rice. *Soil Science and PlantNutrition*. 2001. V.47(3). P.611-620,
46. Ling Yang Feng, Nasir Iqbal. Effect of Sulphur Application on Photosynthesis and Biomass Accumulation of Sesame Varieties. *Agronomy*. 2018. V. 8. P.1-16.
47. Голуб Н.Б., Ситнік О.І., Будика К.Е. Вплив сполук сульфуру на процеси фотосинтезу та дихання у *Chlorella vulgaris*. *Lviv Polytechnic National University Institutional Repository*. 2012. С.153-157. URL: <http://ena.lp.edu.ua:8080/handle/ntb/18625>. (дата звернення: 15.04.2019)
48. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production. *Perspectives and Advances*. 2008. V. 54. P. 621–639.
49. Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах. *Физиология растений*. 2012. Т. 59, №2. С.192-202.
50. Guschina I.A., Harwood J.L. Algal Lipids and Effect of the Environment on Their Biochemistry. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. 2009. P. 1–24.
51. Голуб Н.Б. Технологічна схема культивування мікроводоростей за використання газових викидів для одержання енергоносіїв. *Інтегровані технології та енергозбереження*. 2013. №1. С. 10-14.

52. Основы общей экологии: правило оптимума.
URL: <http://www.bibliotekar.ru/ecologia-6/12.htm> (дата звернення: 15.04.2019)
53. Догадина Т. В., Комаристая В. П., Горбулин О. С., Рудась А. Н. Общая и экспериментальная альгология. Харків: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2013. 148 с.
54. Левтун. И.И. Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів: дис. ... канд. тех. наук : 03.00.20. Київ, 2017. 119 с.
55. SolverBook: свойства и все характеристики сероводорода. URL: <http://ru.solverbook.com/spravochnik/ximiya/soedineniya/serovodorod/> (дата звернення: 24.04.2019)
56. Zahra Amini Khoeyi. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*. 2011.Vol. 20. № 1. P. 153–157.
57. Dere Ş., Sivaci R.. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *J. of Botany*.1998.V.22. p. 13-17.
58. Belotti G. Effect of nitrogen and phosphorous starvations on *Chlorella vulgaris* lipid productivity and quantity under different tropic regimens for biodiesel production. *Am J Plant Sci*. 2013. № 4. P. 44–51.
59. Про затвердження Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях: наказ Міністерство надзвичайних ситуацій України від 11.09.2012 р. № 1192. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1648-12> (дата звернення: 26.05.2019).
60. Библиотека учебной информации: Інструкція з Охорони праці для лаборанта. URL: http://kyrator.com.ua/index.php?option=com_content&view=article&id=872:nstrukcya-dlya-laboranta&catid=38&Itemid=148 (дата звернення: 26.05.2019).